

**Die ErbB-4 Rezeptor Tyrosinkinase-Expression und Regulation in Zellen
des Mammakarzinoms**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Bert Näder

geboren am 17.06.1973 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter :

1. **Prof. Dr. med. Klaus Höffken**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Klinik für Innere Medizin II
Erlangener Allee 101
07747 Jena
2. **Prof. Dr. med. Werner Jaroß**
Technische Universität Dresden
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Fetscherstr. 74
01307 Dresden
3. **PD Dr. Stefan Woelfl**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
07747 Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.11.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	6
1.1.	Die ErbB-Rezeptor-Familie	8
1.1.1.	Der ErbB1-Rezeptor	8
1.1.2.	Der ErbB2-Rezeptor	9
1.1.3.	Der ErbB4-Rezeptor	10
1.2.	Die Liganden	12
1.2.1.	EGF	12
1.2.2.	TGF α	13
1.2.3.	Die Wirkung von Wachstumsfaktoren	13
1.2.4.	Spezifische Liganden des ErbB4	14
1.3.	Therapie	15
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1.	Gewebematerial	17
2.2.	Zelllinien	18
2.2.1.	Zellkultivierung	19
2.2.2.	Zellzählung und Bestimmung der Wachstumskurve	19
2.2.3.	Inkubation der Zelllinien	19
2.3.	Aufarbeitung des Gewebe- und Zell-Materials	20
2.3.1.	Aufbereitung des Zell- bzw. Gewebematerials für die PCR	20
2.3.1.1.	Verwendetes Gewebe-Material	20
2.3.1.2.	Zellkulturen	21
2.3.2.	RNA-Isolierung mit RNeasy	21
2.3.3.	cDNA-Synthese	22
2.3.4.	Die Polymerase - Ketten - Reaktion (PCR)	22
2.3.4.1.	Standard PCR	22
2.3.4.2.	Nested PCR	23
2.3.4.3.	Hotstart PCR	24
2.4.	Semiquantitative Bestimmung des mRNA-Gehaltes	24
2.4.1.	Kompetitorfragment	24
2.4.2.	Aktineinstellung	26
2.4.3.	Gelelektrophorese	27
2.4.4.	Densitometrisches Verfahren zur semiquantitativen Auswertung	27

3.	ERGEBNISSE	28
3.1.	Die ErbB4-Expression in humanen Mammakarzinomen	28
3.1.1.	Die Bestimmung des ErbB4-m RNA-Levels in Tumorproben und in Normalgewebeproben von Patienten mit Mammakarzinomen	28
3.1.2.	Vergleich der ErbB4-mRNA-Level in Tumorgeweben und korrespondierenden Normalgeweben	30
3.1.2.1.	Die Einteilung des Tumorgutes	31
3.1.2.2.	Die alternative Einteilung des Tumorgutes	32
3.2.	Korrelation ErbB4-Expression mit der Expression anderer Erb-Rezeptoren	34
3.2.1.	Der ErbB1	34
3.2.2.	Der ErbB2	35
3.3.	Der ErbB4-Gehalt im Vergleich zu klinischen und pathologischen Parametern	37
3.3.1.	pTNM-Klassifikation und ErbB4	38
3.3.1.1.	T-Kategorie und ErbB4	38
3.3.1.2.	N-Kategorie und ErbB4	39
3.3.1.3.	M-Kategorie in den untersuchten Mammakarzinomen	40
3.3.1.4.	Grading und ErbB4	40
3.3.2.	Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose und ErbB4	41
3.3.3.	Östrogen-Rezeptor-Status und ErbB4	42
3.3.4.	Progesteron-Rezeptor-Status und ErbB4	42
3.3.5.	p53 und ErbB4	43
3.3.6.	Der Proliferationsmarker MIB1 und ErbB4	44
3.3.7.	Ploidie-Status und ErbB4	44
3.3.8.	DNA-Malignitätsgrad und ErbB-4	45
3.4.	Der ErbB4-Rezeptor in Mammakarzinom-Zelllinien	46
3.4.1.	ErbB4 mit ErbB1 und ErbB2 im Vergleich	47
3.4.2.	Die ErbB-Expression unter dem Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren	51
3.4.2.1.	Die ErbB-Expression unter dem Einfluss versch. EGF-Konzentrationen	51
3.4.2.2.	Die ErbB-Expression unter dem Einfluss von EGF und TGF α	54
3.4.2.2.1.	T-47-D	55
3.4.2.2.2.	BT-747	57
3.4.2.3.	Die Wachstumskurven beider Zelllinien unter EGF und TGF α	58
3.4.3.	Die ErbB-Expression unter dem Einfluß von Suramin	63
3.4.3.1.	T-47-D	63
3.4.3.2.	BT-474	65
3.4.3.3.	Die Wachstumskurven beider Zelllinien unter Suramin	67
3.4.4.	Die ErbB-Expression unter dem Einfluß eines Metallo-Proteinase-Hemmers	72
3.4.4.1.	T-47-D	72
3.4.4.2.	BT-474	72
4.	DISKUSSION	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	100

- 6. ANHANG
- 6.1. Literaturverzeichnis
- 6.2. Material für die Zellkultivierung
- 6.3. Verwendete Lösungen
- 6.4. Material für die RNA-Isolierung mit RNeasy
- 6.5. Material für cDNA-Synthese
- 6.6. Material für RT-PCR
- 6.7. Material für die Gelelektrophorese
- 6.8. Zeitlicher Ablauf eines Inkubationsversuches
- 6.9. Benutzte Primer und Kompetitorfragmente
- 6.10. Die pTNM Klassifikation des Mammakarzinoms

1. EINLEITUNG

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau in den Industrieländern. Bei Frauen unter 50 Jahren ist diese Krebsart derzeit sogar die häufigste Todesursache [90]. In Deutschland erkrankt zur Zeit etwa jede zehnte bis zwölfte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. In Deutschland wird jährlich bei 42.000 Frauen ein Mammakarzinom diagnostiziert. 40-50%, d.h. ca. 20.000 Frauen, erleiden nach kurativ intendierter Primärbehandlung ein Rezidiv, an dem sie letztlich versterben. Pro Jahr ist mit ca. 17.000 Todesfällen aufgrund des Mammakarzinoms zu rechnen [48].

Neben hormonellen, umwelt- und ernährungsbedingten Einflüssen werden auch genetische Faktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms verantwortlich gemacht.

Ein risikoadaptiertes Therapiekonzept ist bei der Behandlung des Mammakarzinoms von wesentlicher Bedeutung für das weitere Patienten-Schicksal. Daher ist für die Entscheidung z.B. zwischen brusterhaltender Therapie und Mastektomie oder der Art und Weise der adjuvant systemischen Therapie eine rationale Prognoseabschätzung unerlässlich.

Der Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Sie bestimmen das therapeutische Vorgehen. Ziel ist es, auf dem Boden einer individuellen Prognoseabschätzung die einzelnen Patienten optimal zu behandeln und Unter- bzw. Überbehandlung zu vermeiden. Im klinischen Alltag etablierte Risikofaktoren für Mortalität, das Risiko von Fern-Metastasen sowie von Lokalrezidiven sind: Tumordurchmesser, Lymphknotenstatus, Malignitätsgrad, histologischer Typ, Hormonrezeptorstatus sowie das Alter (siehe Anhang Tab. 6.6.)

Darüber hinaus sind zahlreiche Studien und Untersuchungen zu über 100 weiteren möglichen Prognosefaktoren bzw. prädiktiven Faktoren durchgeführt worden. Nur für einen kleinen Teil dieser neuen Prognosefaktoren konnte eine prognostische Wertigkeit bereits durch mehrere unabhängige Studien bestätigt werden. Hierzu gehören die Tumor-assoziierten Proteasen, der Tumorzellnachweis im Knochenmark, Proliferationsfaktoren wie die S-Phasen-Fraktion, MIB1, TLI und verschiedene Angiogenesefaktoren [76].

Weitere vielversprechende neue Prognosefaktoren, welchen jedoch in verschiedenen Studien bisher uneinheitliche prognostische Wertigkeiten zugeordnet wurden, sind das Kathepsin D, das ErbB2-Onkogen und das Tumorsuppressorgen p53.

Neuere Studien zeigten, dass insbesondere die Familie der ErbB-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung und Progression spielen [36]. Die Mitglieder letztgenannter Familie sind in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand intensiver

Forschung geworden. Vor allem in ErbB1- und ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomen zeigte sich, dass die zwei erstentdeckten Wachstums-Rezeptoren dieser Rezeptor-Familie, der EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor-Regulator -ErbB1-) und der ErbB2-Rezeptor (auch HER2 oder Neu), eine prognostische Aussage in Bezug auf die Metastasierung und die weitere Tumorentwicklung liefern könnten.

So sprach eine ErbB2-Rezeptor-Überexpression in einem metastasierten Mammakarzinom für ein besonders aggressiven und schnellwachsenden Tumor und somit für eine ungünstigere Prognose [26]. Allerdings konnte dieser Zusammenhang in späteren Studien nicht mehr uneingeschränkt bestätigt werden.

Genetische Veränderungen dieser Gene führen zu einer Dysregulation in den Wachstumsfaktor – Signaltransduktionswegen. Die häufigsten Veränderungen sind eine Amplifikation der Gene und/oder eine unkontrollierte Expression der entsprechenden Rezeptoren. Diese konnten bei Patientinnen mit Brustkrebs gefunden werden.

Im Gegensatz zu den beiden erstentdeckten ErbB-Rezeptoren findet man bisher wenig Literatur zu den beiden zuletzt beschriebenen ErbB-Rezeptoren : ErbB4 und ErbB3. Es zeigte sich jedoch, dass besonders die Rezeptoren der ErbB-Familie typischerweise als Dimere biologisch aktiv sind. Neben Homodimeren scheinen insbesondere Heterodimere von entscheidender Bedeutung bei der Funktion der Rezeptor-Familie zu sein. In diesem Zusammenhang ist die Betrachtung des ErbB4-Rezeptors von großem Interesse.

Dieser Rezeptor existiert sowohl als Homo- als auch innerhalb verschiedener Heterodimere. Besonders innerhalb letztgenannter übt der ErbB4-Rezeptor, wie erste Studien belegen, wahrscheinlich einen erheblichen Einfluss auf die Signaltransduktion des ErbB2 und des ErbB1-Rezeptors aus [29].

Studien, welche nach spezifischen Liganden für den ErbB2-Rezeptor suchten, zeigten in diesem Zusammenhang, dass durch eine Heterodimerisation zwischen den unterschiedlichen Mitgliedern der ErbB-Familie eine Vielzahl von Interaktionen möglich ist und nicht wenige der Liganden nur indirekt - beispielsweise über den ErbB4-Rezeptor – auf die ErbB2-Tyrosin-Kinasen-Aktivierung Einfluss nehmen. Vom klinischen Standpunkt aus könnte demnach die prognostische Aussage der Überexpression eines Rezeptors (z.B. ErbB2) ganz entscheidend vom Level der Expression eines anderen Rezeptors abhängen. Weiterhin könnte diese Eigenschaft das Signal-Repertoire eben dieser zahlenmäßig limitierten Rezeptor-Familie ganz entscheidend vergrößern [29].

Aus diesen Gründen erscheint es wichtiger denn je, Studien über den bisher noch wenig untersuchten ErbB4-Rezeptor durchzuführen, der zumindest indirekt über die

Beeinflussung der ErbB1- und ErbB2-Rezeptoren eine interessante biologische Funktion erfüllt.

1.1. Die ErbB-Rezeptor-Familie

Die Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptor - Tyrosinkinase umfasst 4 Mitglieder: den epidermal growth factor receptor (EGFR bzw. ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4).

Gemeinsam ist all diesen Rezeptoren eine zysteinreiche extrazelluläre Domäne, welche für die Ligandenerkennung verantwortlich ist. Dieser folgt in ebenfalls allen vier Rezeptoren ein kurzes hydrophobes, transmembranöses Segment, gefolgt von einer intrazellulären Sequenz, welche die Tyrosin-Kinase-Domäne und verschiedene C-Terminal Strukturen zur Autophosphorylierung enthält.

1.1.1. Der ErbB1-Rezeptor

Der ErbB1 ist ein 170 kDa großes Glykoprotein, welches drei Hauptdomänen enthält. [40]. Er wurde erstmals in einer squamösen Karzinom-Zelllinie der Vulva (A431) isoliert [105].

Es konnte nachgewiesen werden, dass der ErbB1 dem v - ErbB Onkogen - einer leicht veränderten Form des transformierten Gens des Vogel-Erythroblastose-Virus (avian erythroblastosis virus) - sehr ähnlich ist. Die Erythroblastose, eine bei Vögeln vorkommende Erkrankung, gab dann auch dem Rezeptor und der gesamten Familie ihren Namen Erb (Erythroblastose) [28].

Die Entdeckung, dass das v-ErbB – Onkogen des Vogel-Virus (Erythroblastose) eine verkleinerte Form des ErbB1-Gens ist, deutete darauf hin, dass es eine Beziehung zwischen den transformierenden Onkogenen und den Wachstumsrezeptoren gibt. Es häuften sich die Beweise, welche zeigten, dass der ErbB1 in vielen unterschiedlichen Tumoren überexprimiert ist und dies in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose der Erkrankung korrelierte [57].

Der ErbB1-Rezeptor und der ErbB4-Rezeptor

Von besonderem Interesse war der ErbB1-Rezeptor in dieser Arbeit, da er in der Lage ist, mit dem ErbB4-Rezeptor Heterodimere zu bilden. Zahlreiche Studien belegten inzwischen die Existenz solcher Dimere.

Untersuchungen von Bruce D.Cohen et al. zeigten, dass die Transfektion von Zellen mit ErbB4 zu einer erhöhten Ansprechbarkeit der Zelle auf EGF- einem ErbB1-Liganden - führte. Außerdem fand man, dass es als Zellantwort auf die Inkubation mit Heregulin β 2- einem spezifischen ErbB4-Liganden - in Anwesenheit von ErbB4-Rezeptoren zur Transphosphorylierung von ErbB1-Rezeptoren kam [21]. Auch Untersuchungen durch K. Zhang et al. zeigten, dass eine Transphosphorylierung zwischen ErbB1 und ErbB4 sowohl durch EGF als auch durch NDF - ebenfalls einem spezifischen Liganden von ErbB4 - ausgelöst werden konnte. Diese Daten deuteten ebenfalls auf die Existenz von ErbB1:ErbB4-Heterodimeren [111].

In scheinbarem Widerspruch zu der bis dahin beschriebenen wachstums-stimulierenden Funktion des ErbB1 stand die Beobachtung, dass EGF in ErbB1 signifikant überexprimierenden Zellen das Wachstum eher hemmte und zu einer Ausdifferenzierung der Zellen führte als eine Zellteilung zu stimulieren [67]. Weiterhin vermochte eine Aktivierung des ErbB1 in vitro und spontan in vivo die Differenzierung von Dickdarm-Adenokarzinom-Zelllinien zu induzieren [98].

Im Laufe späterer klinischer Untersuchungen zeigte sich, dass der ErbB1 nicht als Standard-Prognosefaktor genutzt werden kann, doch seine wesentliche Mitbeteiligung bei der Genese von Tumorerkrankungen ist unumstritten.

1.1.2. Der ErbB2-Rezeptor

Die Studien über die Expression des ErbB1 bewirkten ein weitverbreitetes Interesse an dieser Art von Rezeptoren - bzw. Liganden -Systemen und eine stark beschleunigte Suche nach zusätzlichen ErbB-Rezeptoren. Die Suche nach verwandten Sequenzen führte 1985 zur Entdeckung eines anderen Membranrezeptors mit einem hohen Grad an Übereinstimmung mit dem ErbB1 – den ErbB2-Rezeptor [56]. Das zugehörige menschliche ErbB2 – Proto-Onkogen, auch HER2 genannt, wurde 1986 von zwei unabhängig forschenden Gruppen entdeckt [107].

Eine Amplifikation dieses Gens, welches auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist, sowie eine Überexpression des entsprechenden 185 kDa großen Glykoproteins konnten in einer signifikanten Proportion in Adenokarzinomen der verschiedensten Art gefunden werden, jedoch bedeutend seltener in anderen Tumor -Typen [32].

Ein weiteres Anzeichen dafür, dass dieses Gen bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielt, ergab sich durch ein experimentelles karzinogenes Modell an Ratten. Die Exposition trächtiger Ratten mit dem karzinogen wirkenden Ethylnitroseharstoff führte zur

Entwicklung eines Tumors des ZNS mit äußerst schnellem Wachstum. Dieser Tumor war - wie sich zeigte - auf eine Punkt-Mutation in eben diesem ErbB2-Gen zurückzuführen. Daher auch der dritte Name „neu“, von dem erzeugten Neuroblastom hergeleitet. Das durch das veränderte Gen geschädigte Protein-Endprodukt - der ErbB2-Rezeptor - war solcherart stabilisiert, dass es zu einer permanenten ligandenunabhängigen Stimulation des Komplexes kam. [6]. Die Expression dieses Ratten-neu-Gens (ErbB2) an der Zelloberfläche bewirkte in anderen Experimenten die Entstehung von Mammakarzinomen in genetisch veränderten Mäusen [71]. Dies wies erstmals auf eine besondere Rolle des ErbB2-Rezeptors in Mammakarzinomen hin.

Auch für den ErbB2-Rezeptor konnte - vergleichbar mit dem ErbB1-Rezeptor - eine Überexpression in verschiedenen Tumoren, vor allem in Mammakarzinomen gefunden werden. Seit einer ersten Studie von Slamon et al., in welcher ein direkter Zusammenhang zwischen dem ErbB2-Gen und einer ungünstigen Prognose bezüglich der 5-Jahres-Überlebensrate bei Mammakarzinomen beschrieben werden konnte, hat sich das Interesse an diesem Onkogen weiter verstärkt [91].

Der ErbB2-Rezeptor hat sich seitdem in zahlreichen Kliniken als ein Marker für die Diagnose, Prognose und Therapie von metastasierten Mammakarzinomen etabliert. Neuere Multivariant-Analysen konnten die Rolle des ErbB2-Rezeptors als Prognosefaktor bei metastasierten Mammakarzinomen allerdings nicht uneingeschränkt bestätigen. Hiervon unabhängig scheint eine Veränderung der Gen-Abschnitte, innerhalb derer die ErbB-Rezeptoren dazu codiert und gesteuert werden, in Zelllinien eine maligne Entartung initiieren zu können.

Die entscheidende Funktion des ErbB2-Rezeptors bei der Transformation, insbesondere von Mamma-Zelllinien, und eine somit nicht unwesentliche Rolle bei der Tumorentwicklung ist demnach jedoch auch bei diesem Rezeptor unumstritten. Für den komplexen Vorgang der Tumorentwicklung scheinen jedoch letztlich eine Vielzahl von Faktoren eine mindestens ebenso große Rolle zu spielen.

1.1.3. Der ErbB4-Rezeptor

Der ErbB4-Rezeptor wurde 1993 in Proben der menschlichen cDNA-library der Zelllinie MDA-MB-453 (Mammakarzinomzelllinie) sowie in menschlichen Herzgewebezellen identifiziert [80].

Das ErbB4-Gen codiert einen 180 kDa großen transmembranösen Tyrosin-Kinase-Rezeptor. Die extrazelluläre Domäne weist starke Ähnlichkeit zu der extrazellulären

Domäne des ErbB3-Rezeptors auf. Die zytoplasmatische Domäne zeigt sich zu 79% mit der des ErbB1-Rezeptors und zu 77% mit der des ErbB2-Rezeptors identisch. Der ErbB4-Rezeptor wird prädominant in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien sowie primären Mammakarzinomen, in normalem Skelettmuskel, Herzmuskel, der Zirbeldrüse, der Hypophyse sowie im Gehirn und im Kleinhirn exprimiert. Niedrige Level des ErbB4-Rezeptors konnten in Zellen der Niere, Bauchspeicheldrüse, Nebenschilddrüse, Hoden, Thymus, Speicheldrüsen und Brustdrüse gefunden werden [80].

Im Gegensatz zu ErbB1 und ErbB2 blieb die eigenständige Bedeutung von ErbB3 und ErbB4 für die Tumorentwicklung und Progression bisher noch weitestgehend ungeklärt.

Allerdings konnten Interaktionen des ErbB4 innerhalb der schon erwähnten Heterodimere nachgewiesen werden, so beispielsweise innerhalb eines ErbB2-ErbB4-Dimers - durch Heregulin als Ligand - oder in ErbB1-ErbB4-Dimeren. Es stellt sich demnach die Frage, inwieweit der ErbB4 - Rezeptor insbesondere bei Mammakarzinomen eine pathologische Bedeutung besitzt. Vor allem die Rolle des ErbB4 Rezeptors innerhalb der ligandenvermittelten Aktivierung von ErbB2 bleibt weiterhin zu klären [80].

Der ErbB4-Rezeptor könnte also durchaus eine Schlüsselstellung im Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen den einzelnen ErbB-Rezeptoren einnehmen. Es erschien deshalb notwendig und gerechtfertigt auf den ErbB4-Rezeptor in dieser Forschungsarbeit näher einzugehen.

Physiologische Funktion des ErbB4-Rezeptors

Der ErbB4-Rezeptor hat schon während der Embryogenese entscheidende physiologische Funktionen zu erfüllen. So erwies er sich als essentieller in vivo - Regulator bei der Herzentwicklung und der Steuerung der Axon-Führung im ZNS. Darüber hinaus reguliert er im Gleichgewicht mit anderen Wachstumsfaktoren das Zellwachstum wie auch die Differenzierung der Zellen innerhalb der schon genannten Gewebe, in denen er physiologischerweise exprimiert wird.

M. Gassmann et al. demonstrierten 1995, dass Nackt-Mäuse, die aufgrund einer genetischen Manipulation nicht in der Lage waren, ErbB4-Rezeptoren zu exprimieren (sogenannte mice lacking erbB4 oder auch ErbB4-Knockout-Mäuse), in der Regel in der mittleren Phase der Embryogenese durch den Abbruch der Entwicklung des myokardialen Trabekelsystems im Herzventrikel starben. Es zeigten sich weiterhin auffallende Veränderungen in der Innervation der Medulla oblongata des ZNS [34].

Marchonni M. A. zeigte 1995 ebenfalls, dass eine veränderte ErbB4-Expression zur Entwicklung von ZNS-Tumor-Formationen führen kann und eine fehlende Expression die Unterbrechung der embryonalen Entwicklung nach ca. 10,5 Tagen zur Folge hat. Weiterhin demonstrierte er, dass Neuregulin an den ErbB4-Rezeptor zu binden vermag.

Neureguline - eine Familie von Proteinen - spielen bei der Muskel-Entwicklung, bei der Neural-Entwicklung wie auch bei der Differenzierung und onkogenen Transformation von Mamma-Epithelien eine entscheidende Rolle [68].

Ohne den Einfluss des ErbB4-Rezeptors scheint also ein Leben - zumindest bei Nackt-Mäusen - nicht oder nur mit starken Schäden des kardialen und neuronalen Organs möglich. Somit erfüllt der ErbB4-Rezeptor zum einen eine wichtige Funktion in der Embryogenese als auch später bei der Zellentwicklung und Zelldifferenzierung.

1.2. Die Liganden

In den letzten Jahren stieg die Anzahl der beschriebenen „ErbB - spezifischen“ Liganden stark an. All diese Wachstumsfaktoren werden als eine - im Vergleich zum Endprodukt - viel größere Vorstufe synthetisiert.

Die „reifen“ Liganden werden dann - abhängig von der jeweiligen Zelle - durch eine posttranslationelle Proteinabspaltung an einem speziellen Teil der extrazellulären Domäne derart verändert, dass ein beispielsweise EGF-ähnlich strukturiertes Molekül entsteht, welches jedoch exakt mit dem für die Zelle typischen Rezeptor zu interagieren vermag. Wichtig hierbei ist, dass eine biologische Aktivität nicht nur für die ungebundene Form, sondern auch für die zellgebundene Vorstufe nachgewiesen werden konnte. Ein Indiz dafür, dass diese Moleküle eine wichtige Funktion innerhalb der Zell-zu-Zell-Kommunikation besitzen.

Ebenso konnte ein pleiotropischer Effekt, also die Kontrolle mehrerer Rezeptorfunktionen durch einen einzigen Wachstumsfaktor, für einen Teil der Liganden gezeigt werden [102]. Dies weist ebenfalls auf eine komplexe Interaktionen zwischen den Rezeptoren wie auch Ligandensystemen hin.

1.2.1. EGF

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) besteht aus 53 AS. Er wurde als erster ErbB-spezifischer Ligand 1972 aus einer Maus-Unterkiefer-Speicheldrüse extrahiert [85].

EGF bindet direkt an den ErbB1-Rezeptor, interagiert wahrscheinlich nur indirekt mit den anderen drei ErbB - Rezeptoren. Es verursacht biologische Antworten in gesunden Tieren, Organ- und Zellkultursystemen, wobei es die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum

stimuliert. Die Art der Wirkung scheint unter anderem von der Dosis abzuhängen [57]. EGF vermag darüber hinaus in vitro und spontan in vivo die Differenzierung von Dickdarm-Adenokarzinom-Zelllinien zu induzieren [98]. EGF spielt demnach offensichtlich auch eine Rolle bei der Zelltransformation.

1.2.2. TGF α

Neuere Studien entdeckten einen weiteren Wachstumsfaktor in Mammakarzinomen: den TGF α (transformierender Wachstumsfaktor α). Die beiden der TGF-Familie zugehörigen Wachstumsfaktoren TGF α und TGF β unterscheiden sich sowohl strukturell als auch in ihrer Wirkung.

In dieser Arbeit war TGF α von Interesse, da es zusammen mit EGF die Tyrosin-Kinase des ErbB1- und - wie Wang et al. 1998 zeigten - auch die des ErbB4-Rezeptors zu aktivieren vermochte [99].

Der Name TGF α entstand ursprünglich aufgrund der Fähigkeit dieses Faktors, reversibel einen transformierten Phänotyp in Fibroblasten bestimmter Nagetiere zu induzieren. Inzwischen weiß man, dass dieser Wachstumsfaktor an vielen Zell-Typen wirkt und von einer großen Vielfalt von normalen und retroviral, chemisch oder onkogen-transformierten menschlichen und von Nagetieren stammenden Zelllinien sowie Brustkrebszellen synthetisiert bzw. sezerniert wird [7] [35] [46].

1.2.3. Die Wirkung von Wachstumsfaktoren

Verschiedene Studien wiesen sowohl wachstumsstimulierende als auch wachstumshemmende Wirkungen von EGF als auch von TGF α nach [57]. Ein ähnliches Verhalten konnte ebenso in Studien beschrieben werden, welche mit p75 - einem unspezifischen ErbB2-Liganden - arbeiteten [66]. Diese Daten unterstützen die Hypothese von Lupu et.al., dass die verschiedenen Wachstumsfaktoren in beide Richtungen wirken können: zum einen zur Stimulation des Zellwachstums und zum anderen zur Hemmung desselben und zur Stimulation der Zelldifferenzierung, je nach Konzentration der Liganden und der korrespondierenden Rezeptoren.

Gemäß einem von Kawamoto T. et al. vorgeschlagenen Modell könnte ein geringer Level an Rezeptoraktivität das Fehlen von Liganden während eines Ruhestadiums bedeuten. Ein mittlerer Level hingegen könnte mit einer Wachstumsstimulation innerhalb der Proliferationsphase und ein hoher Level mit einer Wachstumshemmung und gleichzeitiger Ausdifferenzierung der Zellen assoziiert sein [54]. Eine intermediäre bzw. optimale

Wachstumsstimulation kann demnach auf zwei Wegen erreicht werden: zum einem durch eine Stimulation der in normalem Level exprimierten Rezeptoren und durch eine ausreichende Konzentration an Liganden oder durch eine Überexpression der Rezeptoren bei Liganden - Mangel.

1.2.4. Spezifische Liganden des ErbB4

Infolge der Ergebnisse zahlreicher Studien, die einen Zusammenhang zwischen einer ungünstigen Prognose bei metastasierten Mammakarzinomen und dem ErbB2-Rezeptor-Level herstellen konnten, versuchten zahlreiche Arbeitsgruppen einen spezifischen Liganden für ErbB2 zu finden. Diese Bemühungen blieben allerdings bisher weitestgehend ohne Erfolg.

Längere Zeit glaubte man, das NDF (neu differentiation factor bei Ratten) und das humane Homolog zu NDF, Heregulin, in der Lage wären, die Differenzierung von Brust-Krebs-Zellen über eine direkte Aktivierung von ErbB2 zu stimulieren. Interessanterweise zeigte sich, dass es sich um eine indirekte Transphosphorylisierung des ErbB2-Rezeptors handelte. Heregulin erwies sich in späteren Studien 1993 durch Plowman et al. vielmehr als ein spezifischer Ligand des ErbB4-Rezeptors [79] [80]. Dieser durch Plowman et al. herausgearbeitete Zusammenhang zeigte somit, dass einige der vermeintlichen ErbB2-Liganden zumindest einen Kofaktor - wahrscheinlich den ErbB4-Rezeptor - benötigen, um den ErbB2 - Rezeptor aktivieren zu können. Auch Peles et al. demonstrierten 1993, dass ErbB2 überexprimierende Adeno-Karzinom-Zellen des Ovars, welche kaum oder gar kein ErbB4 aufwiesen, resistent gegenüber einer Stimulation mittels Heregulin/NDF waren. Diese Insensibilität konnte mit Hilfe der Arbeiten von Plowman et al. durch das Fehlen des ErbB4-Rezeptors erklärt werden [78].

In späteren Studien wurde dann eindeutig bewiesen, dass HRG die Phosphorylisierung der Tyrosinkinase von ErbB4 unabhängig von einer ErbB2-Koexpression stimuliert. Es ist anzunehmen, dass der ErbB2-Rezeptor-Anteil des ErbB2/ErbB4-Heterodimers eine stimulierende Rolle bei der ErbB4-Aktivierung zu spielt [9]. Diese Interaktion zwischen ErbB2 und ErbB4 unter Heregulin beruhte wahrscheinlich auf der Existenz von ErbB2:ErbB4-Heterodimeren, welche durch Heregulin über die Bildung einer Kreuzverbindung zwischen dem Heregulin präsentierenden ErbB4-Rezeptor und dem ErbB2-Rezeptor unterstützt wird [29]. Die Fähigkeit von Mitgliedern der ErbB-Subfamilien sich gegenseitig zu beeinflussen oder in einem synergistischen Sinne

miteinander zu wirken ist demnach offensichtlich eine wichtige Eigenschaft dieser Rezeptoren.

Um einen Zugang zur biologischen Rolle der verschiedenen ErbB-Rezeptoren, insbesondere ErbB4 zu bekommen, analysierten K. Zhang et al. die Wirkung von NDF auf das Zellwachstum und die Transformation von Zellen, die mit verschiedenen Kombinationen an ErbB-Rezeptoren transfiziert wurden. Hierbei zeigte sich, dass NDF zwar die Mitogenese, aber nie eine Transformation in Zellen induzierte, welche den ErbB4-Rezeptor allein exprimierten. Andererseits konnte NDF die Zell-Transformation in jenen Zellen induzieren, die neben ErbB4 noch ErbB1 und/oder ErbB2 koexprimierten.

Demnach reicht eine Aktivierung von ErbB4 nicht zur Transformation aus, sondern es bedarf der Aktivierung des ErbB2 über den ErbB4-Rezeptor um eine Transformation zu induzieren. Dies bestätigt die wichtige Rolle des ErbB2 innerhalb der Zell-Entartung, zeigt allerdings auch, dass dieser Prozess durchaus durch ErbB4 verstärkt werden kann. Eine weitere Entdeckung war die Tatsache, dass NDF eine deutlich höhere Affinität zu ErbB4-enthaltenden Heterodimeren besitzt als zu ErbB4-Homodimeren [111]. Auch für Betacellulin, ebenfalls zur EGF-Familie gehörig, wurde eine EGF- und ErbB4-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen-Phosphorylisierende und damit aktivierende Wirkung festgestellt.

Die Daten von Riese D.J. et al. stellten 1996 Betazellulin als weiteren neuen Liganden des ErbB4-Rezeptors heraus. Betazellulin ist ebenfalls ein Mitglied der „epidermal growth factor family“ [82].

Diese Vielzahl von unterschiedlichen Liganden weist darauf hin, dass verschiedene Mitglieder der EGF-Familie offensichtlich ganz eigene Muster der Rezeptor-Aktivierung bewirken und somit unterschiedliche Signal-Wege nutzen. Innerhalb dieser unterschiedlichen Muster scheint der ErbB4-Rezeptor in einem bedeutend größeren Maße eingebunden zu sein, als man dies bisher annahm. Das könnte für die Pathogenese des Mammakarzinoms eine nicht unbedeutende Rolle spielen. Neben der prognostischen Relevanz des ErbB4-Rezeptors sollte dementsprechend mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente auch insbesondere die Rolle des ErbB4-Rezeptors in der Pathogenese des Brustkrebses weiter aufgeklärt werden.

1.3. Therapie

Das ErbB2-Onkogen rückte in letzter Zeit erneut ins Zentrum wissenschaftlichen Interesses, da gezeigt werden konnte, dass der in Herceptin enthaltene Antikörper gegen ErbB2 sowohl allein als auch in Kombination mit einer Standardchemotherapie bei ErbB2-

überexprimierenden Mammakarzinomen erfolgreich eingesetzt werden kann [88] [19]. Damit ist der ErbB2 zukünftig ein wichtiger prädiktiver Faktor einer solchen Immuntherapie.

Betrachtet man die therapeutischen Möglichkeiten bezüglich ErbB1 und ErbB2 im Vergleich, zeigt sich, dass eine Therapie mit ErbB1-spezifischen Antikörpern offensichtlich einen nur sehr limitierten klinischen Nutzen für den Patienten bringt, währenddessen ErbB2 spezifische Regimes (bei ErbB2 überexprimierenden Tumoren) einen deutlichen therapeutischen Nutzen bewirken können [40]. Ein anderer Therapieansatz entstand beim Versuch, eine zytostatische Anti-ErbB2-Therapie mit einem Fusionsprotein für ErbB2-überexprimierenden Tumoren experimentell zu entwickeln. C.G. Siegal et al. konstruierten zu diesem Zweck das Protein HAR-TX β 2, in dem Heregulin β 2 mit einer abgewandelten Form des Pseudomonas-Exotoxins A (PE40) fusioniert wurde. Hierbei zeigte sich, dass noch ein weiterer Kofaktor bzw. Wachstumsrezeptor für eine erfolgreiche Therapie koexprimiert sein musste – der ErbB4-Rezeptor. Es konnte demonstriert werden, dass das Toxin nicht eigentlich an den ErbB2-Rezeptor, wie zuvor angenommen, sondern an den ErbB4-Rezeptor gebunden wurde. Demnach könnte HAR-TX β 2 eine nützliche Substanz sein, um ErbB4- oder ErbB4/ErbB2-überexprimierende Tumorzellen zu markieren und schließlich auch zu eliminieren [89]. Dieses Beispiel verdeutlicht, wie wichtig es ist, den ErbB4-Rezeptor sowohl bei prognostischen als auch bei therapeutischen Betrachtungen mit einzubeziehen.

Die vorgelegte Arbeit will einen Beitrag dazu leisten, die Bedeutung des ErbB4-Rezeptors bei Mammakarzinomen besser zu verstehen.

Hierzu wurde zunächst in unterschiedlichen intraoperativ gewonnenen Gewebeproben aus Mammakarzinomen die ErbB4-Expression bestimmt und mit der Expression des ErbB1- und ErbB2-Rezeptors sowie mit den bisher etablierten Prognosefaktoren bei Brustkrebs korreliert. Diese Studie war besonders interessant, da sie in dieser Form an intraoperativ gewonnen Gewebeproben bisher kaum durchgeführt wurde.

Daraufhin erfolgte die Untersuchung der Expression von ErbB4 in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien.

Im weiteren wurden funktionelle Zusammenhänge bezüglich des ErbB4-Rezeptors untersucht und somit die Rolle des ErbB4-Rezeptors innerhalb der Pathogenese des Mammakarzinoms näher beleuchtet. Aufgrund der beschriebenen Bildung von ErbB1:ErbB4-Heterodimeren und einer entsprechenden Interaktion zwischen diesen beiden Rezeptoren interessierte uns hierbei die Wirkung von EGF und dem EGF-

verwandten TGF α auf die ErbB4-Expression in Korrelation mit der Expression von ErbB1 und ErbB2 an T-47-D und BT-474.

Abschließend wurden zwei therapeutische Ansätze im Zusammenhang mit dem ErbB4-Rezeptor untersucht. Dabei wurde zum einen, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifischen Inhibitoren für den ErbB4-Rezeptor bekannt sind, die Wirkung eines unspezifischen Hemmstoffes, Suramin, auf die ErbB4-mRNA-Expression untersucht.. Suramin vermag unspezifisch alle Mitglieder der ErbB- Familie über die Blockierung Heparin bindender Rezeptoranteile zu hemmen und wurde schon bei der Therapie von Mammakarzinomen eingesetzt.

Zum anderen wurden die Zelllinien mit einer neueren Substanz, dem CGS, einem Matrix-Metallo-Proteinasen-Hemmer, der ebenfalls für den therapeutischen Bereich entwickelt wurde, inkubiert. Aufgrund der Bedeutung von MMP's beim Prozess der Metastasierung und angeregt durch die Ergebnisse von F. J. Xu et al., welche einen Zusammenhang zwischen dem ErbB4-spezifischen Liganden Heregulin und Matrix-Metalloproteinasen dokumentieren, war der Einfluss einer Hemmung dieser Proteinasen auf den ErbB-4-mRNA-Gehalt von Interesse [106].

Innerhalb dieser Arbeit wird also auf Fragen der Expression, der Funktion als auch der Therapie im Zusammenhang mit dem ErbB4-Rezeptor eingegangen werden. Diese Arbeit hofft durch die nun vorliegenden Ergebnisse, einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der biologischen Funktion des ErbB4-Rezeptors, seiner vielfältigen Interaktionen mit anderen Rezeptoren und bezüglich möglicher therapeutischer Ansätze leisten zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

Als Ausgangsmaterial für die im Folgenden beschriebenen Experimente bildeten Gewebeproben aus primären Brust-Tumoren und drei verschiedene Mammakarzinomzelllinien die Basis.

2.1. Gewebematerial

Das Tumormaterial sowie die dazugehörigen klinischen wie pathologischen Daten wurde uns freundlicherweise vom Institut für Pathologie Bad Berka durch Herrn Dr. Andreas Schmidt und Herrn Dr. Jörg Säger zur Verfügung gestellt.

Das Material bestand aus im Rahmen der operativen Therapie extirpierten Tumorgewebe sowie den dazugehörigen tumorfrei erscheinenden Resektionrändern. Dieses Material wurde intraoperativ sofort asserviert und unmittelbar in flüssigen Stickstoff eingelagert. Dieses

wurde anschließend im pathologischen Institut Bad Berka auf ihre Dignität und andere klinisch pathologische Parameter hin untersucht. Ein Teil des nicht für die Diagnostik benötigten exzidierten Tumorgewebes verblieb in der Pathologie Bad Berka, um dort immunhistochemisch von Dr. Sänger aufgearbeitet zu werden. Der andere Teil wurde in unsrem Labor für die Experimente dieser Arbeit aufgearbeitet.

Für die Bestimmung der ErbB4-Expression wurden Gewebeprobe von 36 Tumoren der Mamma sowie Gewebeprobe aus den tumorfreien Resektionsrändern (Normalgewebeprobe) analysiert. Bei der Auswahl der Tumoren wurde darauf geachtet, dass die Histologie vergleichbar war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur invasiv-duktales Mammakarzinome untersucht. Weiterhin wurden nur die Daten solcher Präparate in die Auswertung mit einbezogen, bei denen beide Proben - das Tumorgewebe wie auch das Normalgewebe – auswertbare Ergebnisse lieferten. Dadurch konnte eine Aussage über den ErbB4-mRNA-Level des Tumorgewebes gegenüber dem des Normalgewebes getroffen werden.

2.2. Zelllinien

Innerhalb der Experimente wurden drei Mammakarzinom-Zelllinien („American Type Culture Collection“, Rockville, USA) verwendet, die nachfolgend kurz charakterisiert werden. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte nach Standardverfahren (Anhang Abschnitt 2.5.1.1.).

BT-474: Diese Zelllinie wurde durch E. Lasfargues und W. G. Coutinho 1978 aus einem soliden invasiv-duktalem Karzinom der Brust einer 60 jährigen Frau isoliert [63]. Es handelt sich um eine epitheliale, aneuploide Zelllinie (normalerweise XO), wobei die meisten Chromosomen ein hypertetraploides Bild zeigen. BT-474 ist tumorigen in athymischen Nacktmäusen und bildet Knoten in Amsterdam/IMR – Ratten mit Regression innerhalb von 10 Tagen aus. Die Zelllinie ist empfänglich für das Maus- Mammary- Tumor- Virus (RIII-MuMTV) und kann dessen Replikation unterstützen.

T-47 D: Die Zelllinie T-47 D wurde 1979 durch I. Keydar aus einer Pleura-Metastase einer 54 jährigen Patientin mit einem infiltrativ wachsenden duktales Mamma-Karzinom isoliert [55]. Es konnten Rezeptoren für 17 β -Estradiol, andere Steroide und für Kalzitinin nachgewiesen werden. T-47 D ist eine hypotriploide Zelllinie, die ein epithelähnliches Aussehen zeigt und welche die Tendenz hat, Multilayer zu bilden.

MDA- MB 435 S : Die 1976 durch R. Cailleau isolierte Mutterzelllinie MDA- MB 435 aus einer Pleura-Metastase einer 31 jährigen Patientin mit duktalem Adenokarzinom der Brust bildet die Grundlage für die Entwicklung von MDA-MB 435 S [15].
MDA-MB 435 S ist eine aneuploide Zelllinie.

2.2.1 Zellkultivierung

Das Lagern und Auftauen der Zellen, der Mediumwechsel, das Aufteilen der Zellkulturen sowie das Abernten und das Einfrieren der Zellen erfolgte nach Standardverfahren.

2.2.2. Zellzählung und Bestimmung der Wachstumskurve

Für jede der drei von uns in den Inkubationsversuchen verwendeten Zelllinien wurde die Wachstumskurve bestimmt, am Anfang ohne die Inkubation mit Substanzen und später auch parallel zu den entsprechenden Inkubationsversuchen. So konnte das Wachstumsverhalten der Zellen unter der Inkubation mit einer speziellen Substanz mit ihrem „normalen“ Wachstum verglichen werden. Zum andern konnte dadurch eine Wachstumshemmung durch die Substanz von einer Wachstumshemmung aufgrund einer zu hohen Zelldichte und damit einer sehr hohen Wachstumsrate, unterschieden werden. Die Zellen wurden an Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 6 gezählt. Die Messung der Zellzahl / ml erfolgte mit einem Zellzählgerät, dem Cultur Counter (Z1) der Firma Coulter. Diese Bestimmung war nötig, um die Relevanz der später auf genetischer Ebene bestimmten Ergebnisse dokumentieren zu können und mögliche Fehlerquellen herauszufiltern.

2.2.3. Inkubation der Zelllinien

Die Zellen wurden mit insgesamt vier verschiedenen Substanzen inkubiert :

1. EGF : Epidermaler Wachstumsfaktor der Firma Promega
2. TGF α : Transformierender Wachstumsfaktor alpha der Firma Sigma
3. Suramin : unspezifischer ErbB-Rezeptor-Hemmer
4. CGS : Metallo-Proteinase-Hemmer der Firma Ciba Geigy AG (Basel, Schweiz)

Hierbei wurden für verschiedene EGF-Konzentrationen und für CGS 24-stündige Inkubationsversuche und für EGF, TGF α und Suramin im Vergleich 96-stündige Inkubationsversuche durchgeführt. Die Inkubationsversuche liefen über sechs Tage, wobei an Tag 3, Tag 5 und Tag 6 die Zellzahl ermittelt und die Gesamt - RNA bestimmt wurde. Am Tag 4 wurden alle Zellen gewaschen und das entsprechende Medium gewechselt. Es wurden insgesamt jeweils sechs Inkubationsversuche durchgeführt und ihre Ergebnisse gemittelt.

Hierbei wurden immer nicht inkubierte Zellen in serumhaltigen als auch in serumfreien Medium mitgeführt. Die geschah um Reverenzwerte für die mit entsprechenden Substanzen inkubierten Kulturen zu erhalten. Die Inkubation mit Suramin erfolgte unter serumhaltigen, die Inkubation mit EGF, TGF α und CGS hingegen unter serumfreien Bedingungen. Der zeitliche Ablauf eines 6-tägigen Inkubationsversuches wird durch die im Anhang beigefügte Tab. 6.1. verdeutlicht.

2.3. Aufarbeitung des Gewebe- und Zell-Materials

2.3.1. Aufbereitung des Zell - bzw. Gewebematerials für die PCR

Das Material bestand aus dem Substrat der inkubierten Zelllinien oder aus Tumorgewebe.

Es wurde so aufarbeitet, dass es schließlich möglich war, den m RNA – Gehalt bezüglich des zu untersuchenden Rezeptors semiquantitativ zu bestimmen.

Die Methode der RNA-Gewinnung musste dabei für die Tumoraufarbeitung gegenüber den Zelllinien abgewandelt und optimiert werden, da das Ausgangsmaterial neben den für uns interessanten Tumor– bzw. Normalgewebszellen auch noch Fettzellen und Bindegewebszellen enthielt, die separiert werden mussten.

Die isolierte Gesamt - RNA, wurde mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA – Form umgeschrieben. Die c-DNA erhält den Zusatz c = complementary, da sie als eine Rückübersetzung der nach dem Transkriptionsprozess gespleißten hnRNA keine Introns mehr enthält und sich so, zu der für die Translation modifizierten mRNA, komplementär verhält. Die snRNP's („small nuclear ribonucleoprotein particles“) sind spezielle Protein - Komplexe die den Spleiß-Vorgang intranukleär katalysieren, während die hnRNA die noch Introns enthaltende direkt von der DNA translatierte „Rohform“ der RNA darstellt. Die c-DNA existiert also in dieser Sequenz nicht im Genom, sondern ist eine künstlich geschaffene DNA - Form ohne Introns, welche die Aminosäuresequenz eines speziellen Proteins codiert.

Diese c-DNA wurde dann in einer PCR unter Verwendung eines speziellen Primers amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch quantifiziert (Kap.: 2.3.4.).

2.3.1.1. Verwendetes Gewebe-Material

Das vom Institut für Pathologie Bad Berka durch Herrn Dr. A. Schmidt und Herrn Dr. J. Sänger freundlicher Weise zu Verfügung gestellte kryokonservierte Tumorgewebe wurde bei uns angetaut, mit einem Skalpell und einer chirurgischen Pinzette gesäubert und in drei gleich große Stücke zerteilt. Zwei Teile wurden wieder eingefroren. Der dritte Teil wurde mit dem Skalpell in kleinere Stücke zerteilt und diese anschließend mit einem Homogenisator in

einem 2 ml Eppendorfhütchen auf Eis zu einem Gewebsbrei zerkleinert. Dieses Homogenisat enthielt neben den Tumorzellen, Binde – und Fettgewebszellen. Um diese abzutrennen wurde der Gewebsbrei im nächsten Schritt bei 5000 U/min zentrifugiert. Der dabei entstehende gelbliche Überstand, zum größten Teil aus Fettzellen bestehend, wurde abgenommen und verworfen, der verbliebene Teil mit 500 µl Lysepuffer lysiert

Dieses Tumorgewebslysat wurde danach mit dem RNeasy – Kit weiterverarbeitet (Kap.: 2.3.2.) Das „Normalgewebe“ (Randzone des Resektats) wurde in gleicher Weise bearbeitet.

2.3.1.2. Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden nach mehrmaligen Waschen aus den Zellkulturflaschen abgenommen in PBS suspensiert und bei 800 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und verworfen. Im Zellpellet befinden sich nun alle Zellen zur weiteren Verarbeitung. Das Pellet wurde dann für die RNA – Isolierung mit 700 µL Lysepuffer versetzt.

2.3.2. RNA - Isolierung mit RNeasy

Arbeiten mit RNA verlangt größte Reinheit. Die RNA – Isolierung wurde mit Hilfe eines von der Firma QIAGEN angebotenen RNeasy Total RNA-Kits durchgeführt. Diese Methode vereint selektive Bindungseigenschaften einer auf einem Quarzgel basierenden Membran mit der microspin technology. In dieser Quarzgelmembran wurde die Gesamt-RNA an in der Membran verankerte chemische Bausteine gebunden. Diese Bindung ist stark vom pH-Wert, dem Salz- bzw. Ionengehalt abhängig, so dass die RNA nach einer Reinigung von anderen Zellmaterialien in Elutionen gut herausgelöst werden kann.

Bei der RNA – Gewinnung wurde deshalb das lysierte Material durch eine feine Membran 2 Minuten lang bei 14.000 U/min gereinigt. Danach wurden 700 µl einer 70 % Ethanol – Lösung dem Filtrat hinzu pipettiert. Das Gemisch aus grob gereinigtem Zelllysat und dem Ethanol wurde nun durch eine spezielle m RNA – bindende Membran bei 10000 U/min 15 sec. lang zentrifugiert.

Diese Membran wurde mit der daran gebundenen RNA im folgenden Schritt durch 700 µl einer Waschpuffer – Lösung (RW 1) mit exakt eingestelltem pH-Wert und Salzgehalt 5 Minuten inkubiert und anschließend 15 sec. bei 10000 U/min gewaschen. Dies geschah im Anschluss mit 500 µl einer anderen Waschpuffer – Lösung (RPE) noch zweimal. Die erste Zentrifugation erfolgte für 15 Sekunden bei 10000 U / min. Beim zweiten Mal betrug die Zentrifugationszeit 2 Minuten. Auch diese erfolgte bei 10000 U/min. Dieses zweimalige

Waschen säuberte die Membran von verbliebenen Zellresten, die gegebenenfalls noch in der Membran festsäßen, ohne dabei die membrangebundene RNA aus der Membran zu lösen.

Danach wurde in drei Elutionen die RNA aus der Membran gelöst. Hierbei wurde RNase-freies-Wasser benutzt, dessen pH-Wert und geringer Salzgehalt die Bindung der RNA innerhalb der Membran destabilisierte, so dass die herausgelöste RNA anschließend im Eluat gelöst war. Die erste Elution wurde mit 50 µl RNase-freies-Wasser, die darauffolgende mit 30 µl und die letzte mit 20 µl durchgeführt. So entstanden drei Elutionen mit entsprechend ihrer Reihenfolge sinkendem RNA-Gehalt. Diese Elutionen konnte dann entweder bei -80° C im Tief-Kühlschrank gelagert oder gleich zur cDNA-Synthese weiterverwandt. Die Art und Reihenfolge der oben beschriebenen Schritte blieb auch bei der Tumoraufarbeitung erhalten.

2.3.3. cDNA Synthese

Als erster Schritt innerhalb der Reversen – Transkriptase PCR (RT – PCR) wurde die zuvor gewonnene RNA in die entsprechende cDNA revers transkribiert. Für die DNA – Synthese wurde die RNA – Lösung auf Eis gelagert. In ein Eppendorfhüttchen (1,5 ml) wurden je 2 µl RNA und 6,5 µl steriles Wasser pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben jeweils 1 sec bei 10000 U/min zentrifugiert und in einem vorgewärmten Wasserbad bei 65 ° C für 5 min inkubiert, um eventuell entstandene Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. In dieser Inkubationszeit wurde der Reaktionsmix für alle Proben vorbereitet. Dieser wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Dabei wurde das RNasin und die Reverse Transkriptase erst nach der Hinzugabe aller anderen Komponenten aus dem -20°C Kühlschrank entnommen, da diese beiden Substanzen besonders wärmeempfindlich sind. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch in einen Brutschrank für 60 min bei 37 ° C inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Reverse Transkriptase in einem Zeitraum von 8 min in dem erneut vorgeheizten Wasserbad bei 94 ° C inaktiviert. Die so hergestellte cDNA wurde nun im Kühlschrank bei -20°C tiefgefroren gelagert, um in den darauffolgenden Tagen kontinuierlich in den entsprechenden PCR – Versuchen aufgearbeitet zu werden.

2.3.4. Die Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

2.3.4.1. Standard PCR

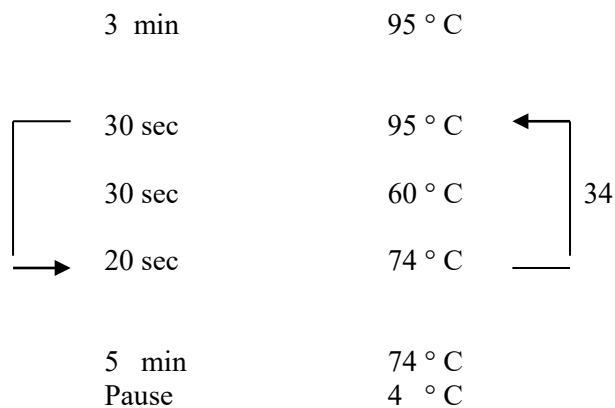
Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde eingesetzt, um cDNA, welche das Korrelat zur mRNA eines bestimmten Proteins darstellt, nachzuweisen und semiquantitativ zu bestimmen.

Die PCR ist eine gentechnologische Methode zur Vermehrung eines definierten DNA-Fragmentes. Die PCR wurde in Biometra-Geräten (UNO ; TRIO) realisiert. Die benutzten sequenzspezifischen Primer sind im Anhang aufgeführt (Tab.: 6.2.1, 6.2.2., 6.3.).

Ansetzen der PCR : Zunächst wurde für alle Proben, bei denen die gleiche DNA-Sequenz zu amplifizieren war, ein gemeinsamer Reaktions-Mix vorbereitet (18,3 µl H₂O, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 1,0 µl Primer (10 mM), 2,0 µl dNTPs (jeweils 2,5 mM), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl). Dieser Mix enthielt die Substanzen in genannter Menge multipliziert mit der Anzahl von benötigten Proben plus einer Kontrollprobe plus einem Sicherheitsreaktionsmix. Danach wurde in die vorher beschrifteten PCR-Tubes je ein µl der jeweiligen cDNA pipettiert. In die Kontrolle wurde stattdessen ein µl sterilen Wassers pipettiert. Zu der cDNA bzw Kontrolle wurden nun 24 µl des Reaktionsmixes pipettiert und dann kurz bei 5000 U / min zentrifugiert. Als Abschluss wurde das Proben – Reaktionsgemisch mit einem dünnen Mineralölfilm bedeckt. Dies geschah um ein Verdampfen der in den Proben befindlichen Flüssigkeit bei der Erwärmung auf 95 ° C zu verhindern. Bei Benutzung der Biometra – Geräte wurde zusätzlich eine Deckelheizung (95 °C) benutzt, welche ein Verdunsten des Reaktionsansatzes während der PCR noch weiter minimierte.

Ein programmierter Zyklus im Thermocycler am Beispiel des ErbB – 4 – Rezeptors:

Amplifikation im Thermocycler



Nach Ablauf der PCR wurden die PCR-Produkte über Agarose-Gelelektrophorese (2.4.3.) aufgetrennt.

2.3.4.2. Nested PCR

Die Methode der Nested-PCR wurde von uns immer dann verwendet, wenn die Menge an amplifizierter DNA nicht ausreichte, um in der sich anschließenden Gelelektrophorese photometrisch eindeutige vergleichbare Banden zu erzeugen. Die Nested – PCR hatte mehrere

Vorteile. Zum einen wurde die Sensitivität erhöht und zu anderen wurden unerwünschte Nebenprodukte reduziert bzw. eliminiert. Allerdings konnten auch hier Artefakte, sogenannte „jumping PCR's“, nachgewiesen werden.

Bei der Nested-PCR, die auch als verschachtelte PCR bezeichnet wird, verwendete man zwei Primerpaare zur Amplifikation, ein äußeres und ein inneres. Der Vorteil dieser Methode, eine erhöhte Spezifität und Sensitivität der Gesamtreaktion, entstand nun dadurch, dass zunächst mit dem äußeren Primerpaar ein etwas größeres Amplikon (PCR-Produkt) synthetisiert wurde und dann in einer zweiten Reaktion mit dem inneren Primerpaar dieses erste Amplikon weiter amplifiziert wurde, wodurch mögliche Nebenreaktionen der ersten Reaktion entfielen. Dadurch konnte am Ende noch so kleine DNA – Konzentrationen sichtbar gemacht werden. In beiden Durchgängen wurden die gleichen Temperaturen verwendet. Die Zyklenzahl betrug allerdings nur 20, nicht aber wie üblich 30 – 35. Dies trug zur Vermeidung unerwünschter PCR – Produkte bei.

Das Substrat für den zweiten PCR –Durchgang stellte 1 µl des Amplikons der ersten PCR dar und musste vorsichtig durch das Mineralölkap hindurch aus dem vorangegangenen PCR – Tube entnommen werden. Die restlichen Schritte waren der im Kap.: 2.3.4.1. beschriebenen Standard – PCR gleich. Von den Primern wurden je 0,5 µl pro Probe eingesetzt.

2.3.4.3. Hotstart PCR

Eines der Probleme, die immer wieder auftreten konnten, war die unspezifische Bindung des Primers an irgendeine DNA –Sequenz, statt der Ziel – Sequenz, oder das Binden der Primer untereinander. Dadurch entstanden unspezifische und nicht verwertbare DNA – Sequenzen, welche zu einer Verschmutzung der Proben führen konnten.

Eine Möglichkeit, diese Fehler zu reduzieren, war , die Taq – Polymerase erst nach dem ersten 5-minütigen Schritt bei 95 ° C in die einzelnen Proben vorsichtig durch die Mineralölschicht hindurch hineinzugeben. Dadurch wurde eine frühzeitige Elongation von miteinander verbundene Primern oder falsch gebundenen Primern verhindert, da diese durch die enorme Hitze vorher noch einmal separiert wurden. Diese Methode wurde ebenfalls zur semiquantitativen Bestimmung mit einbezogen.

2.4. Semiquantitative Bestimmung des mRNA-Gehaltes

2.4.1. Kompetitorfragment

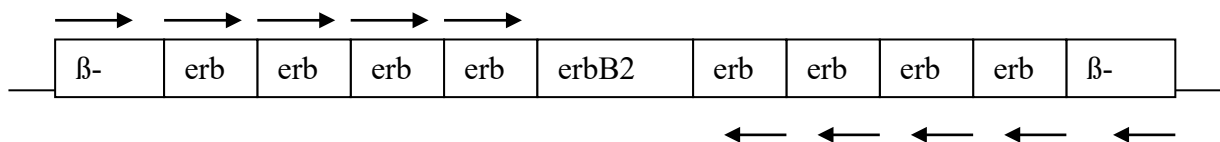
Zur semiquantitativen Bestimmung von mRNA mittels PCR und Gelelektrophorese wurde ein sogenanntes Kompetitorfragment benutzt. Dieses Fragment und demnach auch dessen PCR –

Produkte besaß nun dieselben Primer-Sequenz, wie die des zu amplifizierenden bzw. zu bestimmenden cDNA–Abschnittes. Allerdings mit einer Verkürzung um mehrere 100 Basenpaare gegenüber dem „Original“.

Die genauen Größenverhältnisse sind aus Tab.: 6.2.1. und 6.2.2. ersichtlich. Da die in der PCR benutzten Primer sequenzspezifisch waren und somit nur der entsprechende Anteil des Kompetitorfragments amplifiziert wurde, konnte in unserem Labor ein DNA – Molekül hergestellt werden, welches die Primersequenzen der benötigte Kompetitor – Fragmente der Rezeptoren ErbB 1–4 einschließlich dem des β –Aktins vereinigte. Eine Zusammenfassung aller Primersequenzen ist in Tabelle 6.3. im Anhang aufgeführt.

Das Kompetitorfragment existierte in jeweils zwei zueinander komplementären DNA–Sequenzen, also einer Sense–DNA und der entsprechenden Antisense–DNA.

Abb. 2.1. Das ErbB–Kompetitor–Fragment



Die Pfeile geben jeweils die Richtung an, in welcher die Polymerase liest.

In einer semiquantitativen PCR wurden nun beide Genprodukte: die cDNA und das Kompetitorfragment von den gleichen Primern amplifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße des so entstandenen Amplikons konnten sie in einer darauffolgenden Gelelektrophorese (Kap.:2.4.3.) problemlos aufgetrennt und dargestellt werden. Um die Menge der mRNA abzuschätzen, wurden in einer Verdünnungsreihe definierte Mengen an Kompetitorfragmenten mit der zu untersuchenden cDNA gemischt.

Da die Anzahl der Primer begrenzt war, bildete sich innerhalb der Amplifikation - Reaktion zwischen cDNA und Kompetitorfragment in dem Moment ein Gleichgewicht, wenn Konzentrationen des Kompetitorfragmentes und der cDNA annähernd gleich waren. In diesem Fall war ebensoviel cDNA amplifiziert worden wie Kompetitorfragment und beide geelektrophoretisch aufgetrennten Banden hatten somit die gleiche Intensität.

Um nun die genaue Konzentration des Kompetitorfragmentes herauszufinden, bei der sich innerhalb der Kettenreaktion, bei der Amplifikation beider DNA – Produkte ein Gleichgewicht einstellte und somit eine Angabe der Menge der cDNA möglich wurde, mussten spezielle, für jeden Rezeptor bzw. jedes Protein abgestimmte Verdünnungsreihen vorgenommen werden. Man konnte auf diese Art und Weise gut unterscheiden, ob mehr

Kompetitor-Fragment als cDNA zu Beginn der PCR vorhanden war. In diesem Fall war die untere Bande, welche für das Kompetitor-Amplikon steht, intensiver. Oder im entsprechend umgekehrten Fall, war die obere Bande, welche das Amplikon des zu untersuchenden cDNA-Fragmentes darstellt, gegenüber der unteren Bande intensiver. Genau im Umschlagspunkt zwischen diesen beiden Varianten konnte die nächste Verdünnungsreihe angesetzt werden, um dann bei einer noch feiner gesplitteten Verdünnungsreihe die Konzentration semiquantitativ zu bestimmen.

Die PCR mit dem Kompetitorfragment erfolgte ihrem prinzipiellen Ablauf nach ebenso wie die PCR ohne den Einsatz des Kompetitor-Fragmentes, allerdings mit dem Unterschied, dass in diesem Fall für den Reaktionsmix nun jeweils 1 µl des entsprechenden Kompetitorfragments hinzupipettiert und dafür nur 17,3 µl steriles Wasser verwendet wurde, so dass die Gesamtmenge des Mixes wieder 25 µl betrug.

2.4.2. Aktineinstellung

Diese aufwendige Methode hat jedoch nur Sinn, wenn die Proben zuvor auf ein vergleichbares Ausgangsniveau gebracht werden, da sonst vorangegangene quantitative Unterschiede aus der RNA – Isolation oder cDNA-Synthese übertragen worden wären. In diesem Fall hätten die Ergebnisse nur einen geringen Aussagewert.

Um eine derartige gleiche Einstellung der verschiedenen Proben zu erreichen, brauchten wir eine Referenz – mRNA/cDNA, welche in allen Zellen vorhanden ist. Eine dafür gebräuchliche und auch in anderen Laboren benutzte Kontrolle, ist das β -Aktin. Die mRNA von β -Aktin ist in einer vergleichbaren Konzentration in allen Zellen enthalten und bildet einen Grundbaustein für den Aufbau der Zytoskeletts. Damit vermochte das β -Aktin die Basis zur semiquantitativen Bestimmung des mRNA-Gehaltes der verschiedenen Ausgangsmaterialien darzustellen [8]. Hierzu wurde mit Hilfe des Kompetitors in schon erläuteter Weise, die Konzentration der transkribierten mRNA von β -Aktin mit zahlreichen Verdünnungsreihen bestimmt. Entsprechend der Probe mit der geringsten Konzentration an β -Aktin wurden dann die restlichen Proben auf eben diese verdünnt, so dass in allen Proben annähernd die gleiche Konzentration an β -Aktin vorlag.

Mit diesen eingestellten Proben konnten weitere semiquantitative PCR's durchgeführt werden, deren Ergebnisse dann gut miteinander vergleichbar waren, da alle Proben das gleiche Ausgangsniveau hatten.

Eine andere ebenfalls in der Auswertung genutzte Methode bestand darin, die Aktin-Banden unverdünnt photometrisch in Arbitrary Units jeder einzelnen Probe auszumessen und mit den

ebenfalls photometrisch in Arbitrary Units ausgemessenen Banden der transkribierten mRNA der verschiedenen Rezeptoren bzw. Proteine einen Quotienten zu bilden (Rohwerte / Aktin) (Kap. 2.4.4.). Auf diese Weise konnten ebenfalls Schwankungen innerhalb des β -Aktinniveaus einberechnet und so Artefakte durch Konzentrationsschwankungen vermieden werden, so dass auch in diesem Fall die Ergebnisse miteinander vergleichbar waren. Bei der späteren Aufarbeitung der Ergebnisse wurde diese Variante meist favorisiert, da Verunreinigungen und Ungenauigkeiten bei einer Verdünnung der Proben wegfielen.

2.4.3. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellte ein wichtiges, schnell durchführbares und kostengünstiges Nachweisverfahren von Nukleinsäuren dar. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass durch Auftragen der Nukleinsäuren auf ein Gel und anschließendes Anlegen eines elektrischen Feldes die Wanderung von elektrisch geladenen Teilchen erfolgt und so eine Auftrennung der DNA möglich ist.

Die Auftrennung der DNA bei diesen Experimenten erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Firma BIOMETRA. Wir verwendeten ein 1%iges Agarosegel, welches Ethidiumbromid in einer Konzentration von 2 μ l / 100 ml Agarose enthielt. Zum Auftragen der DNA –Proben wurden 15 μ l DNA verwendet, welche vorher mit 3 μ l Ladungspuffer vermischt worden waren. Bei jeder Elektrophorese wurde in die erste Tasche ein Längenstandard (=Marker=1 Kb-Leiter) aufgetragen, welcher DNA –Fragmente mit genau definierten Größen enthält. Mit Hilfe dieser Marker konnte die Größe der bei der PCR entstandenen DNA- Moleküle kontrolliert werden. In die zweite Tasche wurde stets die Kontrollprobe pipettiert, welche auf Verunreinigungen hinweisen konnte. In den nachfolgenden Taschen wurden die entsprechenden DNA –Proben in oben beschriebener Weise aufgetragen. Nun wurde die Elektrophoresekammer an das Spannungsgerät angeschlossen und bei bis zu 500 V und 200 mA (je nach Gelgröße) die Elektrophorese gestartet.

Die Wanderung der DNA konnte durch das im Ladungspuffer enthaltene Bromphenolblau beobachtet werden. Nach Überschreiten der Mitte des Gels nach etwa 20-30 min wurde die Elektrophorese beendet und die DNA unter UV- Licht betrachtet.

2.4.4. Densitometrisches Verfahren zur semiquantitativen Auswertung

Nachdem die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.4.3.) und damit mit Ethidium-Bromid markiert waren, wurde in einer Vorrichtung der Firma Herolab mit einer hochauflösenden Kamera unter UV-Licht abfotografiert. Die Kamera war direkt mit dem

Computer verbunden, so dass das Bild digitalisiert werden konnte und im TIFF-Format abgespeichert wurde. Anhand dieses Bildes konnte nun der Umschlagspunkt zwischen cDNA-Bande und Kompetitor-DNA-Bande optisch ermittelt werden.

Darüber hinaus konnten mit dem ebenfalls von der Firma Herolab mitgelieferten Programm EASY diese digitalisierten Daten dann densitometrisch in Arbitrary Units bestimmt werden. Die interne Skalierung wurde mit Hilfe der im Bild vorhandenen Graustufen abgestimmt und so eine genaue Messung durchgeführt. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse für die Entsprechenden cDNA der ErbB-Rezeptoren genauso bestimmt werden, wie die im selben Versuch bestimmten Aktinwerte. So konnte aus beiden Werten ein Quotienten gebildet und somit ein vergleichbares Ausgangsniveau geschaffen werden, auf dessen Basis die Ergebnisse verglichen wurden.

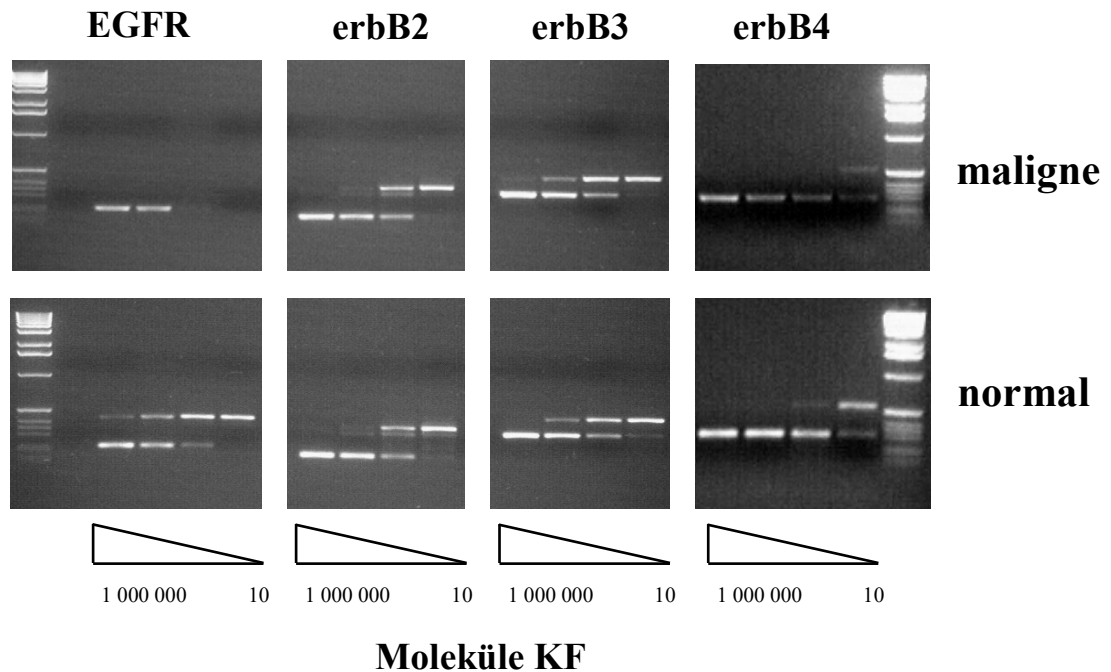
3. ERGEBNISSE

3.1. Die ErbB4-Expression in humanen Mammakarzinomen

3.1.1. Die Bestimmung des ErbB4-mRNA-Levels in Tumorproben und in Normalgewebeproben von Patienten mit Mammakarzinomen

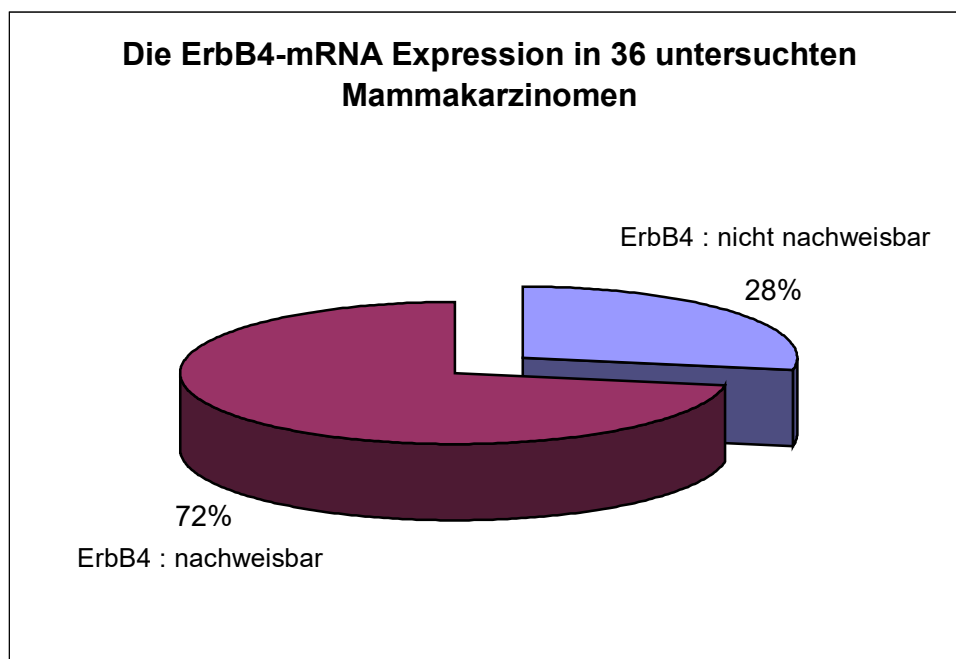
Für die Bestimmung der ErbB4-Expression wurden Gewebeproben von 36 Tumoren der Mamma sowie Gewebeproben aus den tumorfreien Resektionsrändern (Normalgewebeproben) analysiert. Der ErbB4-mRNA-Gehalt wurde durch semiquantitative RT-PCR bestimmt. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben isoliert. Der Nachweis der ErbB4-mRNA erfolgte mit selektiven Primern. Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der Gehalt an β -Aktin-mRNA bestimmt (Kap.: 2.3., 2.4.). Eine Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten ErbB-DNA unter UV-Licht ist in Abb. 3.0 dargestellt.

Abb.: 3.0. Expression der ErbB Rezeptor Tyrosinkinasen in malignem und normalem Mammagewebe (Probe 01)



In 26 von 36 Tumoren (72%) war ErbB4-mRNA nachweisbar. Bei den restlichen 10 von 36 Proben (18%) konnte keine ErbB4-mRNA gefunden werden, obwohl β -Aktin-mRNA nachgewiesen werden konnte (Abb.: 3.1).

Abb.: 3.1.



mRNA-Level	
n.d. (nicht nachweisbar)	10 (28 %)
nachweisbar	26 (72 %)
insgesamt	36 (100 %)

Parallel zur Untersuchung des Tumormaterials wurden auch die zugehörigen Normalgewebeproben auf ihren ErbB4-mRNA-Gehalt hin untersucht. Auch hier wurde eine Bestimmung des β -Aktin-mRNA-Gehaltes durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass auch in normalen Gewebe ErbB4-m-RNA nachzuweisen war. Es konnte ErbB4m-RNA in 27 von insgesamt 36 Normal-Gewebeproben (75%) detektiert werden. Weiter zeigte sich, dass - wie auch schon bei den Tumorproben 10 von 36 Normalgewebe-Proben (25%) keine detektierbaren (n.d.) Mengen ErbB4-mRNA enthielt, obwohl β -Aktin-mRNA nachgewiesen werden konnte (Tab:3.1).

Demnach zeigte sich bei 30 (83 %) von 36 Tumoren eine Korrelation im Sinne einer fehlenden oder nachweisbaren ErbB4-Expression.

Tab.: 3.1.

mRNA-ErbB4-Level	N.: ErbB4 n.d.	N.: ErbB4 nachweisbar	
T.: ErbB4 n.d.	7	3	n=10
T.: ErbB4 nachweisbar	3	23	n=26
Gesamtzahl	10 (28%)	26 (72%)	36 (100%)

T=Tumorgewebe N=Normalgewebe n.d. = nicht nachweisbar

3.1.2. Vergleich der ErbB4-mRNA -Level in Tumorgeweben und korrespondierenden Normalgeweben

Um eine Aussage über einen signifikant erhöhten oder signifikant niedrigen ErbB4-mRNA-Gehalt treffen zu können, mussten beide Proben, die des Tumors und die der korrespondierenden Normalgewebeproben bestimmt und verglichen werden. Nur so konnten Unterschiede im Niveau des ErbB4-mRNA-Levels als eine wirkliche Veränderung gegenüber dem Normalgewebe gewertet und eventuell in Korrelation mit einer malignen und damit pathologischen Entartung der Zelle gebracht werden. Um eine Vergleichbarkeit zwischen Tumor- und Normalgewebe zu erreichen, wurden die jeweiligen cDNAs auf das gleiche β -Aktin-mRNA-Niveau eingestellt. Ausgehend von diesen Proben wurden dann die ErbB4-mRNA-Level bestimmt.

Veränderungen des ErbB4-mRNA -Levels konnte gegenüber dem Normalgewebe verifiziert werden, indem der Quotient aus den beiden gemessenen Werten wie folgt gebildet:

$$\frac{\text{ErbB4 - mRNA - Level Tumorgewebe (T)}}{\text{ErbB4 - mRNA -Level Normalgewebe (N)}} = Q (T/N)$$

Für diesen Quotient wurden Definitionen geschaffen, welche es ermöglichten, auch die Proben zu erfassen, bei welchen keine ErbB4-mRNA nachgewiesen werden konnten, obwohl eine Division durch Null normalerweise unzulässig ist. War im Tumorgewebe keine ErbB4-mRNA (n.d.), im Normalgewebe ErbB4-mRNA jedoch messbar, so wurde für den Quotienten die ErbB4-mRNA-Konzentration des Normalgewebes bzw. $> 0,1$ angegeben.

War das Normalgewebe ErbB4-negativ, im dazugehörigen Tumorgewebe jedoch ErbB4-mRNA nachweisbar, so wurde der Quotient < 10 gesetzt. Waren beide Proben negativ, so wurde für den Quotienten n.d. angegeben. Diese Definitionen wurden in gleicher Weise auf den Quotienten des ErbB1- und ErbB2-Rezeptors angewendet. Dadurch wurde eine Basis geschaffen, auf der die Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

3.1.2.1. Die Einteilung des Tumorgutes

Aufgrund des umfangreichen Versuchsablaufs von der Gewebereinigung bis zur Auswertung am Computer erschien es sinnvoll, einen deutlichen Unterschied in der densitometrischen semi-quantitativen Analyse zu fordern, um von einer Erhöhung oder Erniedrigung des ErbB4-mRNA-Gehaltes zu sprechen. Zu diesem Zweck wurden die Werte der Quotienten in 4 Kategorien unterteilt. Dadurch ließ sich der Anteil mit deutlich höheren oder geringeren ErbB4-mRNA-Level gegenüber dem Normalgewebe darstellen. In diesem Sinne wurde von einem erhöhten ErbB4-mRNA-Level des Tumorgewebes gegenüber dem Normalgewebe ab einem Quotienten von ≥ 10 gesprochen. Von einem signifikant niedrigeren mRNA-Level konnte bei Werten $\leq 0,1$ gesprochen werden (Tab:3.2.).

Tab.: 3.2.

Gruppe	Definition	Q
0	ErbB4 im Tumorgewebe wie auch im Normalgewebe nicht nachweisbar (n.d.)	
1	$T/N < 0,1$	$(Q < 0,1)$
2	$0,1 < T/N < 10$	$(0,1 < Q < 10)$
3	$T/N > 10$	$(Q > 1)$

Gruppe 0: Hier konnte demnach weder im Tumorgewebe noch im Normalgewebe ErbB4-mRNA nachgewiesen werden.

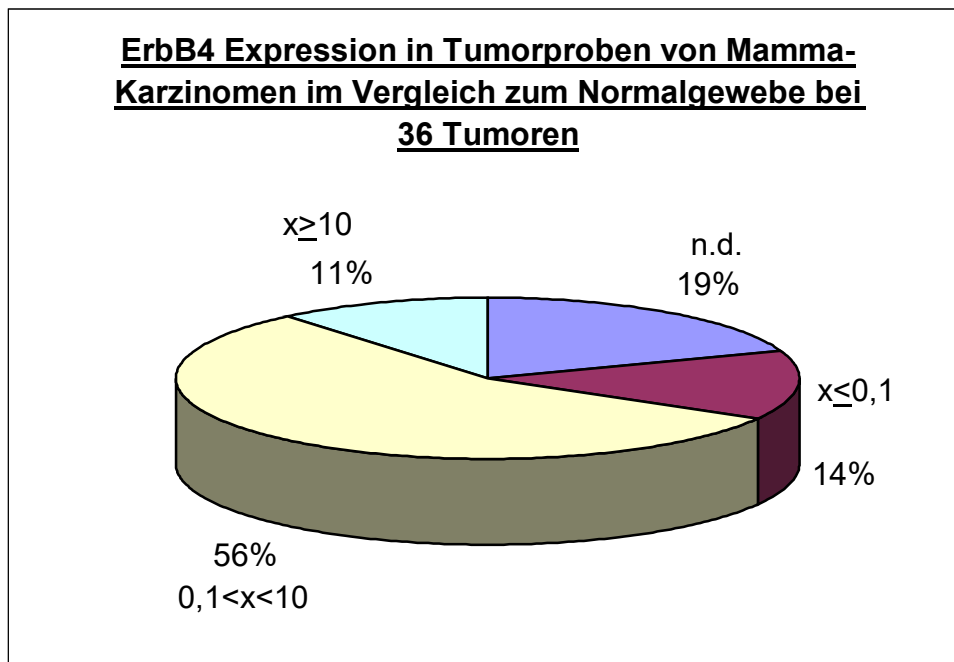
Gruppe 1: In diesem Fall war der ErbB4-mRNA Gehalt des Tumorgewebes signifikant geringer als der des Normalgewebes.

Gruppe 2: Hier war der ErbB4-mRNA-Gehalt des Tumorgewebes dem des Normalgewebes vergleichbar

Gruppe 3: In dieser Gruppe war der ErbB4-mRNA-Gehalt des Tumorgewebes gegenüber dem Normalgewebes signifikant erhöht.

Im Vergleich zum Normalgewebe war der ErbB4-mRNA Gehalt in 4 von 36 Tumoren (11%) deutlich erhöht, in 5 von 36 Proben (14%) deutlich niedrig und in 7 von 36 Proben (19%) nicht nachweisbar. In 20 von 36 Fällen (55%) war der ErbB4-mRNA-Level im Tumor- und Normalgewebe vergleichbar (Abb.: 3.2.).

Abb. 3.2.



Gesamtmenge	n.d.	$T/N \leq 0,1$	$0,1 < T/N < 10$	$T/N \geq 10$
36 (100%)	7(19%)	5 (14%)	20 (55%)	4 (11%)

3.1.2.2. Die alternative Einteilung des Tumorgutes

Ein direkter Vergleich des ErbB4-mRNA-Gehaltes der Tumor-Proben mit dem der korrespondierenden Normalgewebe ergab folgende Kategorien:

Tab.: 3.3.

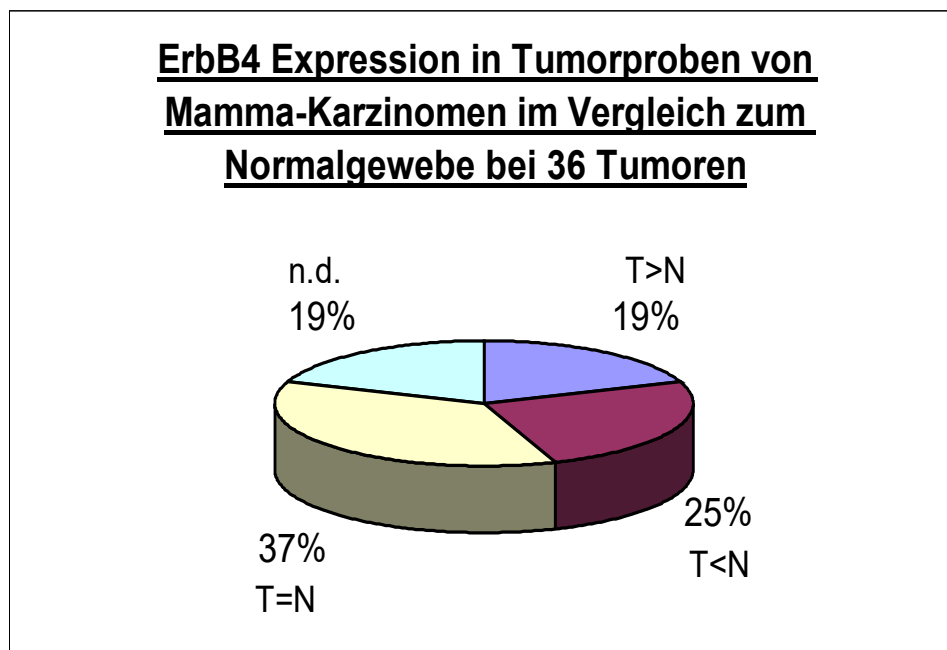
Gruppe	Definition	Q
0	ErbB4 im Tumorgewebe wie auch im Normalgewebe not detectable (n.d.)	
1	ErbB4-mRNA-Level des Tumorgewebes (T) < ErbB4-mRNA-Level des Normalgewebes (N)	$Q < 1$
2	ErbB4-mRNA-Level des Tumorgewebes (T) = ErbB4-mRNA-Level des Normalgewebes (N)	$Q = 1$
3	ErbB4-mRNA-Level des Tumorgewebes (T) > ErbB4-mRNA-Level des Normalgewebes (N)	$Q > 1$

- Gruppe 0:** Es konnte weder im Tumorgewebe noch im Normalgewebe ErbB4-mRNA nachgewiesen werden.
- Gruppe 1:** Der ErbB4-mRNA-Gehalt des Tumorgewebes war kleiner als der des Normalgewebes.
- Gruppe 2:** Hier war der ErbB4-mRNA-Gehalt des Tumorgewebes gleich dem des Normalgewebes.
- Gruppe 3:** Der ErbB4-mRNA-Gehalt des Tumorgewebes war größer als der des Normalgewebes.

Im Vergleich zum Normalgewebe war der ErbB4 – mRNA-Gehalt in 7 von 36 Tumoren (19%) höher als im Normalgewebe, in 9 von 35 Proben (25%) geringer und in 7 von 36 Proben (9%) nicht nachweisbar.

In 13 von 36 Fällen (37%) war der ErbB4-mRNA -Level in Tumorgewebes gleich dem des Normalgewebes (Abb.: 3.3.).

Abb.: 3.3.



Gesamtmenge	n.d.	T<N	T=N	T>N
36 (100%)	7 (19%)	9 (25%)	13 (37%)	7(19%)

Diese Einteilung zeigte sich jedoch ungenauer als die in Kap. 3.1.2.1. genannte, da aufgrund des umfangreichen Versuchsablaufs nicht jede kleinere Schwankung des ErbB4-mRNA-Gehaltes eine tatsächliche Änderung des ErbB4-mRNA-Gehaltes bedeuten muss. Für die Darstellung deutlicher und deshalb aussagekräftiger Veränderungen des m-RNA-

Gehaltes wurde deshalb die in Kap.3.1.2.1. beschriebene Einteilung der gebildeten Quotienten zur Auswertung und Diskussion gewählt.

Auch für weitere Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit erwies sich die Einteilung der Quotienten wie sie in Kap. 3.1.2.1. beschrieben wurde, als sinnvoll.

3.2. Korrelation der ErbB4-Expression mit der Expression anderer Erb-Rezeptoren

3.2.1. Der ErbB1

Die semiquantitative Bestimmung des ErbB1-mRNA-Gehaltes ergab, dass in 23 von 36 Tumorproben (64%) ErbB1-mRNA nachweisbar war. In 13 von 36 Proben (36%) war keine ErbB1-mRNA zu finden. In den Normalproben hingegen wurde bei 32 von 36 Proben (89%) ErbB1-mRNA nachgewiesen. In 4 von 36 Proben (11%) konnte diese mRNA dagegen nicht gefunden werden (Tab.: 3.4.)

Tab.: 3.4.

ErB1-mRNA-Level	Tumorgewebe	Normalgewebe
	Proben-Anzahl	Proben-Anzahl
n.d.	13 (36%)	4 (11%)
nachweisbar	23 (63%)	32 (89%)
insgesamt	36 (100%)	36 (100%)

Mit den auf gleichem β -Aktin-Niveau ermittelten Werten wurde der in Kap. 3.1.2. beschriebene Quotient gebildet. Um den Anteil der signifikant höheren oder geringeren ErbB1- mRNA - Level gegenüber dem Normalgewebe heraus filtern zu können, wurde der T/N - Quotient des ErbB1-mRNA-Gehaltes wie im Kap. 3.1.2. beschrieben unterteilt.

Im Vergleich zu tumorfreien Resektionsrändern war der ErbB1-mRNA Gehalt in 3 von 36 Tumoren (8%) deutlich erhöht, in 20 von 36 Fällen (56%) deutlich geringer und 3 von 36 Proben (8%) nicht nachweisbar. In 10 von 36 Fällen (28%) war der ErbB1-mRNA-Level im Tumor- und Nichttumor - Gewebe vergleichbar (Tab.: 3.5.).

Tab.: 3.5.

Gesamtmenge	n.d.	$T/N \leq 0,1$	$0,1 < T/N < 10$	$T/N \geq 10$
36 (100%)	3 (8%)	20 (56%)	10 (28%)	3 (8%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurden anschließend die beiden Rezeptoren ErbB4 und ErbB1 auf eine eventuelle Korrelation untersucht (Tab.: 3.6.):

Tab.: 3.6.

		ErbB1-Level bzw EGFR-Level range 0-10(median: 0,17)			
ErbB4-Level					
Gruppe	range: 0-100 (median: 1)	n.d.	T/N \leq 0,1	0,1<T/N<1 0	T/N \geq 10
0	n.d. n=7	2 (29%)	4 (57%)	0 (0%)	1 (14%)
1	T/N \leq 0,1 n=5	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)
2	0,1<T/N<10 n=20	0 (0%)	9 (45%)	9 (45%)	2 (10%)
3	T/N \geq 10 n=4	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0(0%)
Gesamt 36 (100%)		3 (8%)	20 (56%)	10 (28%)	3 (8%)

Es zeigten sich im Chi-Quadrat-Test auf der mRNA-Ebene keine deutliche Korrelation von ErbB4 und ErbB1. Auffallend war jedoch, dass in der kleinen Gruppe der ErbB4-überexprimierenden Tumoren in 25% der Fälle kein ErbB1-Rezeptor nachweisbar war und in den restlichen 75% der Fälle ein gegenüber dem Normalgewebe ausschließlich verringerter ErbB1-mRNA-Level gefunden werden konnte. Dies könnte auf eine inverse Verbindung zwischen der ErbB4 und ErbB1 hinweisen.

In dem anderen Anteil der untersuchten Karzinome, bei welchen eine verringerte Expression des ErbB4-Rezeptors nachgewiesen wurde, konnte ebenfalls zu 80% eine Verringerung des ErbB1-mRNA-Gehaltes gemessen werden. Es scheint, als ob beide Extreme, die ErbB4-Überexpression wie auch die erniedrigte Expression von ErbB4 tendenziell mit einer verringerten ErbB1-Expression einhergehen könnten.

Auffallend war jedoch auch, dass generell über 50% der Tumoren einen verringerten ErbB1-mRNA-Level gegenüber dem Normalgewebe aufwiesen, während ein verhältnismäßig kleiner Teil - weniger als 10% - eine ErbB1-Überexpression zeigten.

3.2.2. Der ErbB2

Die Bestimmung der ErbB2-mRNA konnte innerhalb der hier untersuchten Tumoren bei einem Tumor aus Materialgründen nicht durchgeführt werden, so dass die Ergebnisse zu 35 Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben vorliegen. In 29 von 35

Tumorproben (83%) war ein ErbB2-mRNA-Gehalt nachweisbar. In 6 von 35 Proben (17%) war keine mRNA zu finden.

In den tumorfreien Resektionsrändern wurde ebenfalls bei 29 von 35 Proben (83%) ErbB2-mRNA nachgewiesen. In 6 von 35 (17%) konnte dagegen ebenfalls keine mRNA gefunden werden (Tab.:3.7.).

Tab.: 3.7.

ErB2-mRNA-Level	Tumorgewebe Proben-Anzahl	Normalgewebe Proben-Anzahl
n.d.	6 (17%)	6 (17%)
nachweisbar	29 (83%)	29 (83%)
insgesamt	35 (100%)	35 (100%)

Mit den auf gleichem β -Aktin-Niveau ermittelten Werten wurde der in Kap. 3.1.2. beschriebene Quotient gebildet.

Im Vergleich zu tumorfreien Resektionsrändern war der ErbB2-mRNA Gehalt in 3 von 35 Tumoren (9%) deutlich erhöht, in 5 von 35 (14%) deutlich geringer und in 5 von 35 (14%) nicht nachweisbar. In 22 von 35 Fällen (62%) war der ErbB2-mRNA Level im Tumor- und Normalgewebe vergleichbar (Tab.: 3.8).

Tab.: 3.8.

Gesamtmenge	n.d.	$T/N \leq 0,1$	$0,1 < T/N < 10$	$T/N \geq 10$
35 (100%)	5 (14%)	5 (14%)	22 (62%)	3 (10%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurden anschließend die beiden Rezeptoren ErbB4 und ErbB2 auf eine eventuelle Korrelation hin untersucht(Tab.: 3.9).

Tab.: 3.9.

Gruppe	ErbB4-Level range: 0-100 (median: 1)	ErbB2-Level range 0-100 (median: 1)			
		n.d.	$T/N \leq 0,1$	$0,1 < T/N < 1$	$T/N \geq 10$
0	n.d. n=7	3 (43%)	0 (0%)	3 (43%)	1 (14%)
1	$T/N \leq 0,1$ n=5	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)
2	$0,1 < T/N < 10$ n=19	2 (11%)	2 (11%)	14 (74%)	1(5%)
3	$T/N \geq 10$ n=4	0 (0%)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
	Gesamt 35 (100%)	5 (14%)	5 (14%)	22 (63%)	3 (9%)

Bei diesen Werten, zeigte sich - wie auch schon im Fall des ErbB1-mRNA-Gehaltes - ein erstaunlich geringer Anteil an ErbB2-überexprimierenden Tumoren von weniger als 10 %, obwohl in der Literatur ein Anteil von bis zu 25% beschrieben wird. Der Anteil der Tumoren, mit einem gegenüber dem Normalgewebe deutlich verminderten ErbB2-mRNA-Gehalt machte jedoch - im Gegensatz zum ErbB1-mRNA-Gehalt - ebenfalls nur 14% aus. Eine Korrelation von ErbB4 und ErbB2 auf der mRNA-Ebene konnte auch hier im Ghi-Quadrat-Test nicht ermittelt werden.

Bemerkenswert erscheint jedoch, dass in allen Tumoren, in denen eine deutliche Veränderung des ErbB4-Levels nachgewiesen werden konnte, auch ErbB2-mRNA nachweisbar war. Die Tumoren, in welchen keine ErbB2-mRNA gefunden werden konnte, verteilten sich dagegen auf Tumorgruppen, bei welchen keine Veränderung des ErbB4-mRNA-Gehaltes festgestellt werden konnte. Aufgrund der zahlenmäßig sehr kleinen ErbB2-mRNA-negativen Gruppe scheint dieser Zusammenhang jedoch eher zufällig.

3.3. Der ErbB4-Gehalt im Vergleich zu klinischen und pathologischen Parametern

Nachdem die Expression des ErbB4-Rezeptors in Mammakarzinomen nachgewiesen war und Korrelationen des ErbB4-mRNA Gehaltes zu ErbB2 und ErbB1 durchgeführt waren, stellte sich die Frage, ob es Zusammenhänge zwischen einer ErbB4-Expression und anderen für die Prognosestellung bedeutsamen pathologischen Parametern der Mammakarzinome gibt.

Dazu wurden die Tumorgewebeproben im Institut für Pathologie Bad Berka auf verschiedene Kriterien hin untersucht. Die Daten wurden uns freundlicherweise von Dr. Andreas Schmidt und Dr. Jörg Säger zur Verfügung gestellt.

Die überwiegend mit konventionellen Methoden erfassbaren Eigenschaften von Mammakarzinomen können durch eine große Zahl von etwa 80 sogenannten Prognosefaktoren komplettiert werden, deren Aussagekraft und Stellenwert jedoch sehr unterschiedlich ist. Nur wenige dieser Faktoren bzw. deren Kombination in Verbindung mit konventionell erarbeiteten Tumordaten genügen heute den definierten Kriterien für die Prognosefaktoren [47].

Mit Hilfe gültiger Kriterien, wie statistische Signifikanz, prognostische Unabhängigkeit, klinische Relevanz, sind wichtige Prognosefaktoren geprüft und nach ihrer Bedeutung im Sinne eines Ranking vom College of American Pathologists (1994) subklassifiziert worden (siehe Tab. 6.4. + Tab. 6.5. Anhang).

Die Tumorproben dieser Arbeit wurden untersucht auf:

1. pTNM – Stadium
2. Differenzierungsgrad
3. Estrogenrezeptor-Status
4. Progesteronrezeptor-Status
5. p53-Gen
6. Ploidie
7. MIB1-Status
8. DNA – Malignitätsgrad

Hierfür standen von 34 Tumorproben die Daten zur Verfügung. In den nun folgenden Kapiteln wird die Verteilung dieser etablierten Prognosefaktoren genauer betrachtet.

3.3.1. pTNM Klassifikation und ErbB4

3.3.1.1. T-Kategorie und ErbB4

Hierbei ergab sich, dass 15 Mammakarzinome (44%) sich im Stadium T1 befanden, 16 der Proben (47%) wiesen das Stadium T2 auf und 3 der Tumoren (9%) zeigten das Stadium T4. T3 war innerhalb der untersuchten Tumorgruppe nicht vertreten (Tab.: 3.12).

Tab.: 3.12.

Tumorcharakteristik	Gesamtmenge	Tumorausdehnung T nach TNM Klassifikation			
		T=1	T=2	T=3	T=4
invasiv duktal	34 (100%)	15 (44%)	16 (47%)	0 (0%)	3 (9%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend die Tumorausdehnung (T) mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.13).

Tab.: 3.13.

		Tumorausdehnung T nach TNM Klassifikation			
Gruppe	erbB4-T/N range : 0 – 100 (median : 1)	T=1	T=2	T=3	T=4
0	T/N = n.d. (n = 7)	2 (29 %)	2 (29 %)	0 (0 %)	3 (42 %)
1	T/N < 0,1 (n = 4)	2 (50 %)	2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
2	0,1 < T/N < 10 (n = 20)	10 (50 %)	10 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
3	T/N > 10 (n = 3)	1 (34 %)	2 (66 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	Gesamt 34 (100%)	15 (44%)	16 (47%)	0 (0%)	3 (9%)

Hierbei zeigte sich im Chi-Quadratstest keine Korrelation zwischen dem ErbB4-mRNA-Gehalt und der Tumorausdehnung (T). Jedoch fiel eine leichte Tendenz zu fehlenden/niedrigen ErbB4-mRNA-Gehalt auf.

3.3.1.2. N-Kategorie und ErbB4

Die operativ entfernten Lymphknoten aller hier untersuchten 34 Tumoren wurden in Bad Berka histologisch aufgearbeitet. Die entsprechenden Nodalstadien wurden den entsprechenden Tumoren zugeordnet. Diese Daten wurden uns freundlicher Weise zur Verfügung gestellt, so dass diese mit unseren Ergebnissen bezüglich der ErbB4-Expression verglichen werden konnten. Hierbei konnte bei 17 Mammakarzinomen - also exakt der Hälfte der untersuchten Tumoren - eine Lymphknoten-Beteiligung nachgewiesen werden. Die andere Hälfte war LK-negativ (Tab.: 3.14).

Tab.: 3.14.

Tumorcharakteristik	Gesamtanzahl	Tumoren ohne Anzeichen für eine LK-Beteiligung	Tumoren mit eindeutigen Anzeichen für eine LK-Beteiligung
invasiv duktal	34 (100%)	17 (50%)	17 (50%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend der Nodalstatus mit der ErbB4-Expression korreliert.

Tab.: 3.15.

		LK-Befall N nach TNM Klassifik.			Tumoren LK- pos.
Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 – 100 (median : 1)	N=0	N=1	N=2	N > 0
0	T/N = n.d. (n=7)	3 (43 %)	3 (43 %)	1 (14 %)	4 (57 %)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	2 (50 %)	2 (50 %)	0 (0 %)	2 (67 %)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	10 (50 %)	10 (50 %)	0 (0 %)	10 (48 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	2 (67 %)	1 (33 %)	0 (0 %)	1 (33 %)
	Gesamt 34 (100%)	17 (50%)	16 (47%)	1 (3%)	17 (50%)

Hierbei zeigte sich eine klare Gleichverteilung der ErbB4-Expression auf die unterschiedlichen Nodalstadien und somit keine Korrelation im Chi-Quadratstest.

3.3.1.3. M-Kategorie in den untersuchten Mammakarzinomen

Das Metastasierungs-Stadium war zum Zeitpunkt der Operation nur bei insgesamt 3 Tumoren bestimmbar. Diese 3 Tumoren hatten Fern-Metastasen. Bei allen anderen lagen keine Daten vor, bzw. war zum Zeitpunkt der Tumorbestimmung eine Metastasierung nicht auszuschließen.

3.3.1.4. Grading und ErbB4

Das Schnittmaterial aller 34 Tumoren wurde in Bad-Berka mikroskopisch und nach dem Malignitätsgrad unterteilt. Vier Tumoren(12%) erwiesen sich als gut differenziert (G1). Bei 28 der Proben (82%), also der Mehrzahl jedoch, wurde eine mäßige Differenzierung - Grad 2- und bei 2 Tumoren eine schlechte Differenzierung - welche Grad 3 entspricht – dokumentiert (Tab.: 3.16).

Tab.: 3.16.

	Differenzierungsgrad der Tumorzelle			
Tumorcharakteristik	Gesamtanzahl	Grad 1	Grad 2	Grad 3
invasiv duktal	34	4 (12%)	28 (82%)	2 (6%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend der Malignitätsgrad mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.17).

Tab.: 3.17.

		Differenzierungsgrad G		
Gruppe	ErbB4-T/N range : 0 – 100 (median : 1)	G = 1	G = 2	G = 3
0	T/N = n.d. (n=7)	0 (0 %)	5 (71 %)	2 (29 %)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	0 (0 %)	4 (100 %)	0 (0 %)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	1 (5 %)	19 (95 %)	0 (0 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	Gesamt 34 (100%)	4 (12%)	28 (82%)	2 (6%)

Beim Vergleich der ErbB4-Expression mit dem Malignitätsgrad der Tumoren zeigte sich eine schwach signifikante Korrelation (Chi=3,58). In dieser drückt sich eine inverse Beziehung zwischen dem ErbB4-mRNA-Gehalt und dem Malignitätsgrad aus. Je entdifferenzierter die Tumorzelle, um so niedriger erwies sich interessanterweise die ErbB4-Expression.

3.3.2. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose und ErbB4

Für diese Korrelation wurde das Alter angenommen, in welchem sich die Patienten zum Zeitpunkt der Operation ihres Tumors befanden. Innerhalb des Patientengutes war eine Altersverteilung von 40 – 85 Jahre gleichmäßig zu verzeichnen. Das Alter wurde in 4 Altersgruppen zu unterteilen, wobei die Kategorie vier 15 Jahre umfasst, da die Altersgruppe zwischen 80-85 mit nur 3 (9%) von insgesamt 34 Patienten zu klein gewesen wäre.

Die Gruppen setzten sich wie folgt zusammen:

Patientengruppen vom und einschließlich 40. Lbj. bis und einschließlich 49. Lbj., vom und einschließlich 50. Lbj. bis und einschließlich 59. Lbj., vom und einschließlich 60. Lbj. bis und einschließlich 69. Lbj., vom und einschließlich 70. Lbj. bis und einschließlich 85. Lbj.

Von den 34 Tumorpatienten befanden sich zum Zeitpunkt der Operation 5 Patienten im Alter zwischen 40 und 49 Jahren (15%). Weitere 7 Patienten (21%) befanden sich im Alter zwischen 50 und 59 Jahren. 9 Patienten (26%) waren zu diesem Zeitpunkt zwischen 60 und 69 Jahren. Die restlichen 13 Patienten (38%) befanden sich in Alter zwischen 70 und 85 Jahren (Tab.: 3.18).

Tab.: 3.18.

Altersverteilung	innerhalb der	Patienten	zum OP-Zeitpunkt	in Jahren
Gesamtanzahl	40-49	50-59	60-69	70-85
32 (100%)	5 (15%)	7 (21%)	9 (26%)	13 (38%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend das Manifestationsalter mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.19).

Tab.: 3.19.

	erbB4-T/N	Korrelation nach dem Alter zur OP in Jahren range : 44-85 (median:: 63)			
Gruppe	range : 0 – 100 (median : 1)	40-49	50-59	60-69	70-85
0	T/N = n.d. (n=7)	2 (29%)	2 (29%)	2 (29%)	1 (3%)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	0 (0%)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	3 (15%)	3 (15%)	5 (25%)	9 (45%)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	0 (0%)	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)
	Gesamt 34 (100%)	5 (15%)	7 (21%)	9 (26%)	13 (38%)

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Alter und dem ErbB4-mRNA-Gehalt gefunden werden.

3.3.3. Östrogen-Rezeptor-Status und ErbB4

Von den insgesamt 33 untersuchten Tumorproben (100%) hatten 27 Proben (82%) einen positiven Estrogen-Rezeptor-Status. Sechs der untersuchten Proben (18%) erwiesen sich als estrogen-negativ (Tab.: 3.20).

Tab.: 3.20.

Tumor-Charakteristik	Gesamtanzahl	Estrogen – Rezeptor negativ	Estrogen – Rezeptor positiv
invasiv duktal	33 (100%)	6 (18%)	27 (82%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend ER-Status mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.21).

Tab.: 3.21.

Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 – 100 (median : 1)	Estrogenrezeptor – Level	
		ER negativ	ER positiv
0	T/N = n.d. (n=6)	2 (34%)	4 (66%)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	1 (25 %)	3 (75%)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	2 (10 %)	18 (90 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	1 (34 %)	2 (66 %)
	Gesamt 33 (100%)	6 (18%)	27 (82%)

3.3.4. Progesteron-Rezeptor-Status und ErbB4

Von den insgesamt 33 in Bad Berka bezüglich des PgR-Statuses untersuchten Tumorproben (100%) hatten 29 Tumoren (88%) einen positiven Progesteron-Rezeptor-Status. Vier der unters. Proben (12%) erwiesen sich als Progesteron-negativ (Tab.: 3.22).

Tab.: 3.22.

Tumor-Charakteristik	Gesamtanzahl	Progesteron-Rezeptor-negativ	Progesteron-Rezeptor-positiv
invasiv-duktal	33 (100%)	4 (12%)	29 (88%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend die PgR-Status mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.23).

Tab.: 3.23.

		Progesteronrezeptor – Level	
Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 - 100 (median : 1)	PgR-negativ	PgR-positiv
0	T/N = n.d. (n=6)	1 (16 %)	5 (84 %)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	1 (25 %)	3 (75 %)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	2 (10 %)	18 (90 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	2 (66 %)	1 (34 %)
	Gesamt 33 (100%)	4 (12%)	29 (88%)

Für keinen der beiden untersuchten Steroidrezeptoren konnte eine Korrelation mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt nachgewiesen werden. Die Verteilung der ErbB4-Expression war in beiden Fällen vergleichbar.

3.3.5. p53 und ErbB4

Von den insgesamt 34 untersuchten Tumorproben (100%) war in 23 Fällen (68%) kein p53-Gen nachweisbar. Bei 11 der untersuchten Proben (32%) konnte hingegen das p53-Gen nachgewiesen werden (Tab.: 3.24).

Tab.: 2.24.

Tumor-Charakteristik	Gesamtanzahl	p53 < 20%	p53 ≥ 20%
invasiv-duktral	34 (100%)	23 (68%)	11 (32%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend p53 mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.25).

Tab.: 3.25.

	erbB4-T/N range : 0 - 100 (median : 1)	p53 – Level range : 0% – 90% (median : 0%)	
Gruppe		p53 < 20%	p53 ≥ 20%
0	T/N = n.d. (n=7)	4 (57 %)	3 (43 %)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 4)	4 (100 %)	0 (0 %)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	12 (60 %)	8 (40 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	3 (100 %)	0 (0 %)
	Gesamt 34 (100%)	23 (68%)	11 (32%)

Auch innerhalb des Vergleiches zwischen p53 und dem ErbB4-mRNA-Gehalt ergab sich keine Korrelation.

3.3.6. Der Proliferationsmarker MIB1 und ErbB4

Von den insgesamt 34 untersuchten Tumorproben (100%) war in 29 Fällen (85%) das Ki-67-Gen nachweisbar. Bei 5 der untersuchten Proben (15%) konnte dieses Gen hingegen nicht nachgewiesen werden (Tab.: 3.26).

Tab.: 3.26.

Tumor-Charakteristik	Gesamtanzahl	MIB1 < 20	MIB1 ≥ 20
Invasiv-dukta	34 (100%)	5 (15%)	29 (85%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend MIB-1 mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.27).

Tab.: 3.27.

		MIB 1 (Proliferationsfaktor) range : 10% – 70% (median : 40%)	
Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 – 100 (median : 1)	MIB 1 < 20%	MIB 1 ≥ 20%
0	T/N = n.d. (n=7)	0 (0 %)	7 (100 %)
1	T/N ≤ 0,1 (n = 4)	1 (25 %)	3 (75 %)
2	0,1 < T/N < 10 (n = 20)	3 (15 %)	17 (85 %)
3	T/N ≥ 10 (n = 3)	1 (34 %)	2 (66 %)
	Gesamt 34 (100%)	5 (15%)	29 (68%)

Der Proliferationsmarker MIB-1 zeigte ebenfalls keine Korrelation zum ErbB4-mRNA-Gehalt. Es war jedoch auffallend, dass alle Tumoren, in welchen keine ErbB4-Expression nachgewiesen werden konnten, eine stärkere Anfärbung des Kerns mit MIB-1 aufwiesen.

3.3.7. Ploidie-Status und ErbB4

20 der auf ihren Ploidiegrad hin untersuchten 32 Tumoren erwiesen sich als aneuploid, 12 (34%) hingegen als diploid, gemischt diploid/tetraploid oder als rein tetraploid (Tab.: 3.28).

Tab.: 3.28.

Ploidiegrad der Tumorzelle			
Tumorcharakteristik	Gesamtanzahl	D; D/T ; T	A
invasiv dukta	32 (100%)	12 (37%)	20 (63%)

A = aneuploid; D = diploid; T = tetraploid

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend der Ploidie-Status mit der ErbB4-Expression korreliert (Tab.: 3.29).

Tab.: 3.29.

		Ploidie der Tumorzelle	
Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 – 100 (median : 1)	D; D/T; T	A
0	T/N = n.d. (n=7)	4 (57 %)	3 (43 %)
1	$T/N \leq 0,1$ (n = 2)	0 (0 %)	2 (100 %)
2	$0,1 < T/N < 10$ (n = 20)	7 (35 %)	13 (65 %)
3	$T/N \geq 10$ (n = 3)	1 (34 %)	2 (66 %)
	Gesamt 32 (100%)	12 (37%)	20 (63%)

Zwischen dem Ploidie-Status und der ErbB4-Expression konnte im Chi-Quadrattest ebenfalls keine Korrelation ermittelt werden.

3.3.8. DNA-Malignitätsgrad und ErbB-4

33 Mammakarzinome konnten in Bad Berka auf ihren DNA-Malignitätsgrad hin untersucht werden. Von allen ermittelten Werten des DNA-MG's wurde der Median (1,29) gebildet und mit seiner Hilfe die folgende Aufteilung vorgenommen.

17 (52%) der auf ihren DNA-MG hin untersuchten 33 Tumoren zeigten einen DNA-MG unter bzw. gleich 1,29.

Bei 16 (48%) Tumoren hingegen war der DNA-MG größer als 1,29 (Tab.: 3.30).

Tab.: 3.30.

DNA-MG (Median 1,29)			
Tumorcharakteristik	Gesamtanzahl	DNA-MG $\leq 1,29$	DNA-MG $> 1,29$
invasiv duktal	33 (100%)	17 (52%)	16 (48%)

Innerhalb der in Kap. 3.1.2.1. beschriebenen Einteilung wurde anschließend der DNA-MG mit der ErbB4-Expression korreliert.

Tab.: 3.31.

		DNA Malignitätsgrad (DNA-MG) Range : 0,16 - 3,22 (median : 1,29)	
Gruppe	erbB4-T/N-Quotient range : 0 - 100 (median : 1)	DNA-MG \leq 1,29	DNA-MG $>$ 1,29
0	T/N = n.d. (n=7)	2 (29 %)	5 (71 %)
1	T/N \leq 0,1 (n = 3)	1 (33 %)	2 (67%)
2	0,1 < T/N < 10 (n = 20)	13 (65 %)	7 (35 %)
3	T/N \geq 10 (n = 3)	1 (33 %)	2 (66 %)
	Gesamt 33 (100%)	17 (52%)	16 (48%)

Auch hierbei zeigte sich keine nachweisbare Korrelation.

3.4. Der ErbB4-Rezeptor in Mammakarzinom-Zelllinien

Nachdem der ErbB4-mRNA-Gehalt in den 36 Tumoren der Mamma bestimmt und mit dem EGF-, dem ErbB2-Rezeptor und verschiedenen klinischen sowie pathologischen Parametern korreliert worden war, wurden die nun folgenden Untersuchungen an kultivierten Mammakarzinomzelllinien durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurden 3 Mammakarzinom-Zelllinien (BT-474 ; T-47-D und MDA-MB-435-S) genutzt (Kap. 2.2.).

Zunächst wurde der ErbB4-mRNA-Gehalt dieser 3 Zelllinien bestimmt und miteinander verglichen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA der zuvor kultivierten Zellen isoliert. Mit Hilfe dieser wurde anschließend die cDNA synthetisiert, welche die Grundlage für die ErbB-spezifischen RT-PCR's bildete.

Der ErbB4-mRNA-Gehalt wurde danach an gelektrophoretisch aufgetrennten und densitometrisch bestimmten Banden abgelesen und verglichen (Kap.: 2.4.).

Dabei zeigte sich, dass nur in 2 der untersuchten Zelllinien ErbB4-mRNA nachweisbar war, nämlich in T-47-D und BT-474 ; in der Zelllinie MDA-MB 435S dagegen nicht.

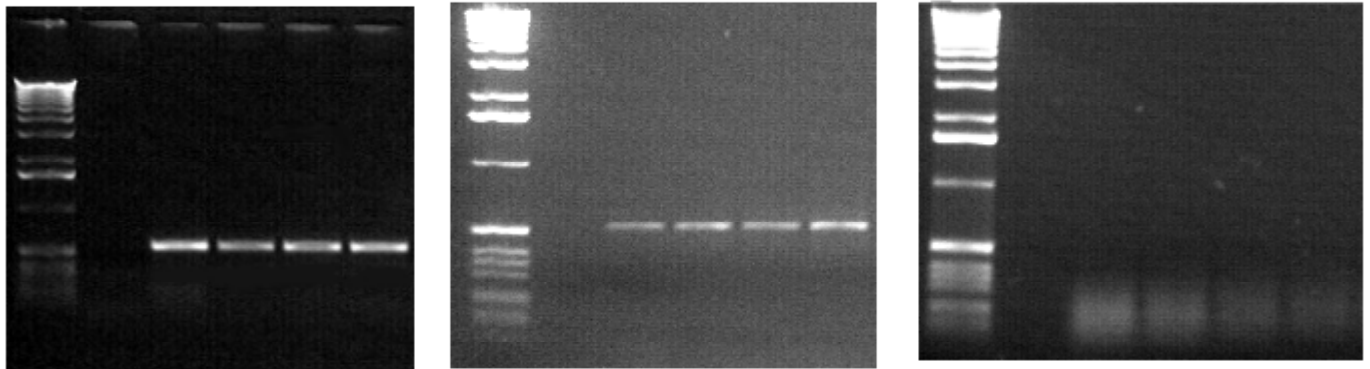
Nachdem ErbB4-mRNA in 2 der Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde der Gehalt der m-RNA semiquantitativ bestimmt.

Hierfür wurde der Level an β -Aktin-mRNA gemessen und die Proben durch Verdünnung auf die niedrigste Aktin-Konzentration der Versuchsreihe auf ein Niveau gebracht.

Anschließend wurde der genaue ErbB4-mRNA-Gehalt in T-47-D und BT-474 bestimmt (Abb.: 3.3.).

Abb.: 3.3.

Die Expression der ErbB4-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in den untersuchten Zelllinien



M K 1 2 3 4 M K 1 2 3 4 M K 1 2 3 4
T-47 - D BT - 474 MDA - MB - 235 S

(M: Marker K: Kontrolle (Pro Zelllinie jeweils 4 Proben unterschiedlicher Kulturen))

Hierbei zeigte sich, dass T47-D mit $9,40 \text{ E}+03$ einen höheren mRNA-Gehalt als BT-474 mit $4,70 \text{ E}+02$ aufwies. Im Gegensatz hierzu konnte bei MDA-MB 435S kein ErbB4-mRNA-Gehalt nachgewiesen werden.

3.4.1. ErbB4 mit ErbB1 und ErbB2 im Vergleich

Die schon im ersten Teil der Arbeit an primären Mammakarzinomen untersuchte Expression von ErbB1 und ErbB2 wurde im Folgenden an den drei Zelllinien T-47-D, BT-474 und MDA-MB-435S bestimmt (Kap.: 2.3.)

Bei T-47-D wurde dabei für ErbB1 der Wert $9,40 \text{ E}+03$ und für ErbB2 $9,40 \text{ E}+04$ ermittelt. In der Zelllinie BT-474 hingegen wurde ein ErbB1-mRNA-Gehalt von $9,40 \text{ E}+04$ und ein ErbB1-mRNA-Gehalt von $9,40 \text{ E}+05$ gemessen. Für MDA-MB-435S zeigte sich ein ErbB1-mRNA-Gehalt von $9,40 \text{ E}+02$ und für ErbB2 ein Gehalt von $4,70 \text{ E}+02$ (Tab.:3.32).

Tab 3.32.

Rezeptoren			
Zelllinien	ErbB4	ErbB1 (EGFR)	ErbB2
T-47-D	$9,40\text{E}+03$	$9,40\text{E}+03$	$9,40\text{E}+04$
BT-474	$4,70\text{E}+02$	$9,40\text{E}+04$	$9,40\text{E}+05$
MDA-MB-435 S	n.d.	$9,40\text{E}+02$	$4,70\text{E}+02$

ErbB4: Beim Vergleich des ErbB4-mRNA-Gehaltes zwischen den 3 untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien war feststellbar, dass T-47-D mit $9,40 \cdot 10^3$ den höchsten Gehalt an ErbB4-mRNA aufwies und damit das 20-fache des mRNA-Gehaltes in BT-474. Den „geringsten“ ErbB4-mRNA-Gehalt - da nicht nachweisbar - hatte jedoch MDA-MB-435S.

ErbB1: Der Vergleich des ErbB1-mRNA-Gehaltes zeigte hingegen, dass hier BT-474 mit $9,40 \cdot 10^3$ den höchsten Gehalt an ErbB1-mRNA aufwies und damit das 10-fache des mRNA-Gehaltes ($9,40 \cdot 10^3$) in T-47-D und das 100-fache von dem der MDA-MB-435S Zelllinie. Den geringsten ErbB1-m-RNA-Gehalt hatte aber auch hier MDA-MB-435S mit $9,40 \cdot 10^2$, also nur 1/10 der mRNA in T-47-D.

ErbB2: Der Gehalt an ErbB2-mRNA erwies sich bei BT-474 ebenfalls als am höchsten. Mit $9,40 \cdot 10^5$ betrug er das 10-fache des mRNA-Gehaltes ($9,40 \cdot 10^4$) in T-47-D und das 2000-fache von dem der MDA-MB-435S Zelllinie.

Den geringsten ErbB2-m-RNA-Gehalt hatte auch hier MDA-MB-435S mit $4,70 \cdot 10^2$, also 1/200 der mRNA in T-47-D. (Abb.: 3.4.).

Abb.: 3.4

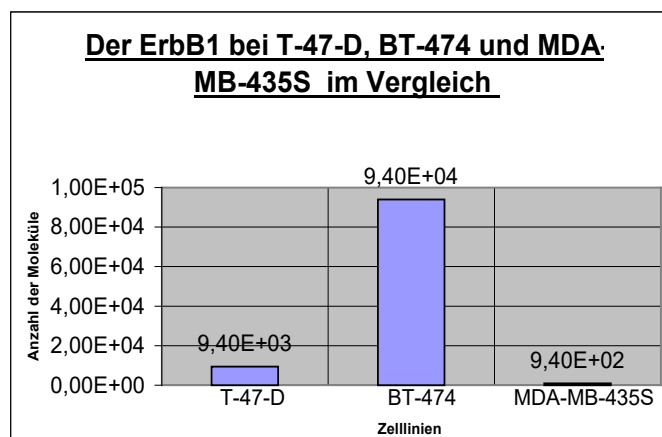
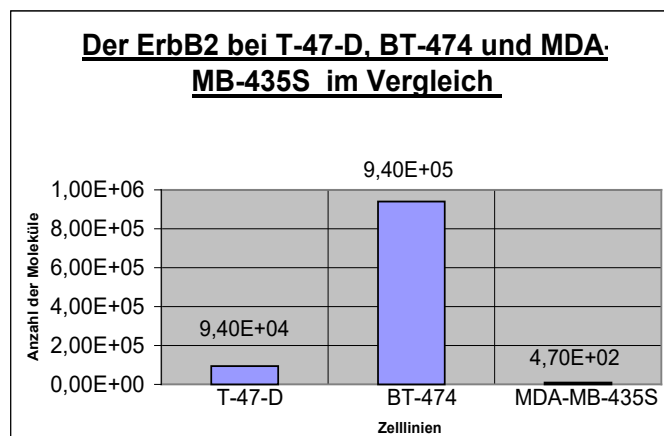
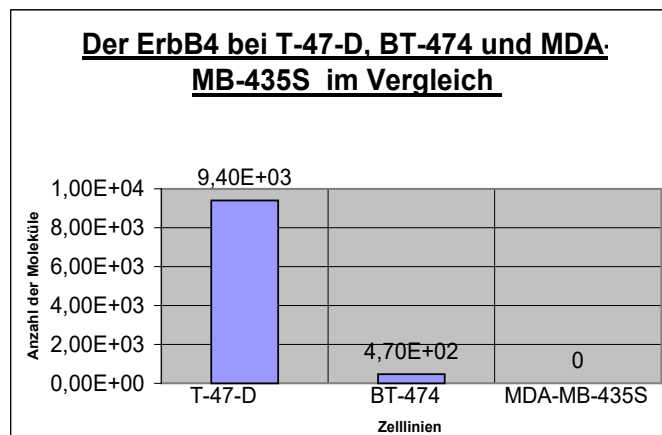
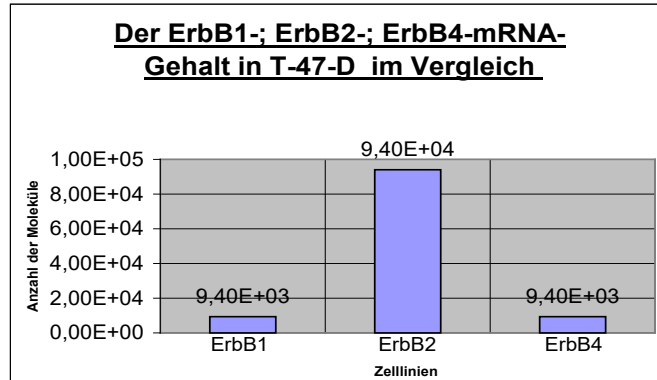


Abb.: 3.5.

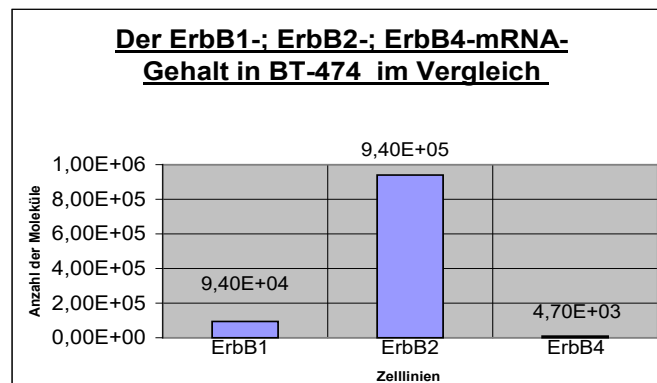
T-47-D

In dieser Zelllinie war die ErbB2-mRNA am stärksten vertreten und damit 10-fach stärker nachweisbar als die von ErbB1 und ErbB4, welche eine gleich hohe Konzentration aufwiesen (siehe Abb.).



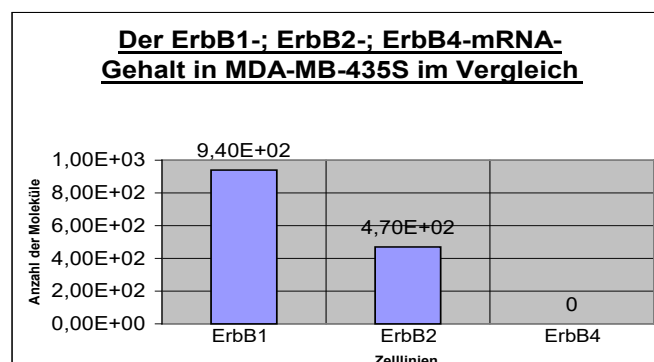
BT-474

In dieser Zelllinie war die ErbB2-mRNA ebenfalls am stärksten vertreten und zwar 10-fach höher als ErbB1-mRNA und 2000-fach höher als ErbB4-mRNA. Somit ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei T-47-D, wenn auch ein geringerer ErbB4-mRNA-Gehalt nachzuweisen war (siehe Abb.).



MDA-MB-435S

Ein ganz anderes Ergebnis wurde bei MDA-MB-435S ermittelt. In dieser Zelllinie war - im Gegensatz zu den beiden anderen Zelllinien - der ErbB1-mRNA-Level am höchsten und zwar 2-fach so hoch wie ErbB2. Interessanterweise konnte in dieser Zelllinie kein ErbB4 nachgewiesen werden (siehe Abb.).



3.4.2. Die ErbB-Expression unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren

In den nun folgenden Inkubationsversuchen wurden die zwei Zelllinien T-47-D und BT-474 mit ein oder zwei Wachstumsfaktoren EGF und/oder TGF α ein oder mehrere Tage inkubiert.

Beim ersten Teil der Inkubationsversuche wurde die Gesamt-RNA nach 24 h isoliert. Bei den restlichen Inkubationsversuchen, welche sechs Tage lang andauerten, wurde an Tag 3, Tag 5 und Tag 6 die Zellzahl ermittelt und die Gesamt - RNA bestimmt. Am Tag 4 hingegen wurden alle Zellen gewaschen und das entsprechende Medium gewechselt (Tab. 6.1. Anhang). Nach der sich anschließenden Aktin-Bestimmung wurden die Proben auf den geringsten Aktin-Level der Versuchsreihe verdünnt oder die unterschiedlichen Aktin-Werte rechnerisch in die Ergebnisse mit einbezogen, um eine vergleichbare Basis zu schaffen (Kap. 2.4.2.).

3.4.2.1. Die ErbB-Expression unter dem Einfluss versch. EGF-Konzentrationen

Als erstes wurden zwei Inkubationsversuche mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an EGF: 10 ng, 50 ng, 100 ng - in serumfreier Umgebung durchgeführt. Diese EGF-Konzentrationen wurden mit den Zellen für 24 h inkubiert. Das geschah in erster Linie zu dem Zweck, einen Hinweis auf die optimale EGF-Konzentration für die weiteren Inkubationsversuche zu erhalten. Aufgrund der abgestuften EGF-Konzentrationen konnte somit die dosisabhängige EGF-Wirkung untersucht werden. Die Ergebnisse wurden gemittelt. Zugleich wurde immer eine nicht inkubierte Zell-Kultur (Kontroll-Kultur) angesetzt. Deren Werte bildeten als Referenzwert die Basis für den Vergleich gegenüber inkubierten Zellkulturen, wodurch etwaige Unterschiede deutlich gemacht werden konnten.

Es wurde in diesem Inkubationsversuch - wie auch in den folgenden Versuchen - ein Quotient gebildet, der das Verhältnis des gemessenen Wertes in der inkubierten Kultur zum Referenzwert der Kontroll-Kultur darstellt.

$$\frac{\text{mRNA-Level in Arbitrary Units der inkubierten Kultur}}{\text{mRNA-Level in Arbitrary Units der nicht inkubierten Kultur}} = Q2$$

Der Informationsgehalt dieses Quotienten in allen Inkubationsversuchen lässt sich wie folgt beschreiben: War es aufgrund der Inkubation zu einem Anstieg des mRNA-Gehaltes

gegenüber der Kontroll-Kultur gekommen, so war der Quotient $Q2 > 1$, bei einer Verringerung war der Wert $Q2 < 1$. War $Q2 = 1$ so hatte die Inkubation innerhalb des Inkubations-Zeitraumes keine Auswirkung auf den untersuchten mRNA-Level.

ErbB4: Bei der Inkubation der Zellen mit 10 ng EGF war der ErbB4-mRNA-Gehalt gegenüber dem mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um 21% erhöht. Demgegenüber zeigte sich bei einer Konzentration von 50 ng eine Reduktion der ErbB4-mRNA um -34% und bei 100 ng um -24%. Demnach wurde der ErbB4-mRNA-Gehalt im Vergleich zur Kontroll-Kultur im zeitlichen Verlauf tendenziell reduziert.

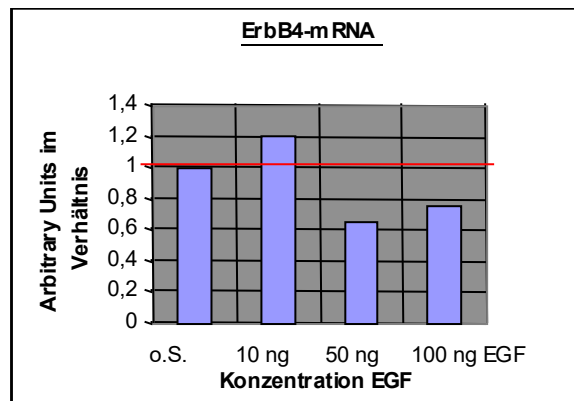
Da bei einer Konzentration von 50 ng EGF der deutlichste Effekt sichtbar war, wurde diese Konzentration in den folgenden Inkubationsversuchen verwendet.

Weiterhin wurde auch der mRNA-Gehalt der zwei anderen ErbB-Rezeptoren, ErbB1 und ErbB2 bestimmt.

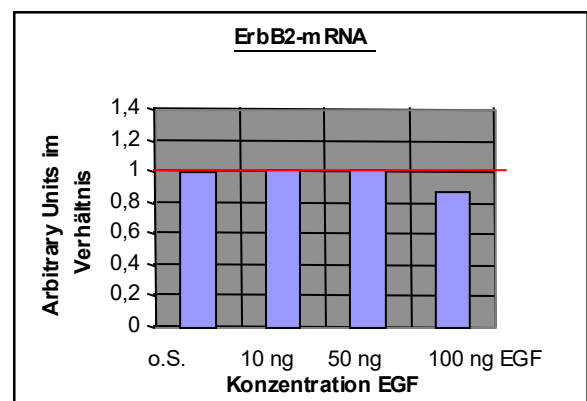
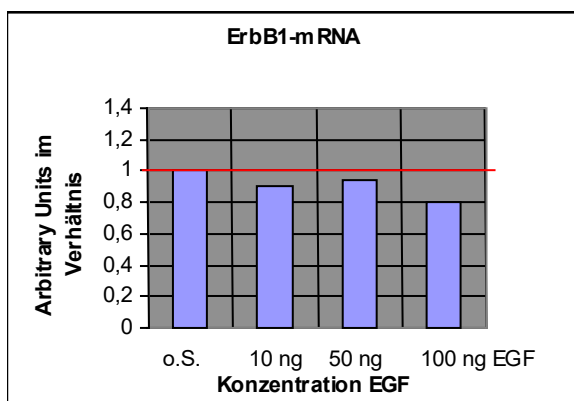
Allerdings zeigten sich bei der Inkubation der Zellen mit EGF weder für den ErbB1-Rezeptor noch für den ErbB2-Rezeptor signifikante Veränderungen des mRNA-Gehaltes. Die genannten Ergebnisse sind in Abb. 3.6. dargestellt.

Abb.: 3.6.

Der ErbB4-mRNA-Gehalt von T-47-D unter der Inkubation mit 10 ng, 50 ng und 100 ng EGF im Vergleich zu dem ErbB1- und ErbB2-mRNA-Gehalt unter gleichen Bedingungen



Rezeptor	o.S.	o.S.	o.S.	o.S.
	0 ng EGF	10 ng EGF	50 ng EGF	100 ng EGF
ErbB4	1	1,21	0,66	0,76
ErbB1	1	0,9	0,94	0,81
ErbB2	1	1,02	1,01	0,88



3.4.2.2. Die ErbB-Expression unter dem Einfluß von EGF und TGF α

Anhand der Ergebnisse im ersten Inkubationsversuch zeigte sich, dass eine längere Inkubationszeit nötig war, um Veränderungen innerhalb des mRNA-Gehalts nachzuweisen.

In dem folgenden Versuch wurden zwei unterschiedliche Wachstumsfaktoren, EGF und TGF α , eingesetzt, um etwaige Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten im Einfluss auf die ErbB4-Expression darzustellen. Die Zelllinien wurden über 5 Tage hinweg mit beiden Substanzen inkubiert. Für beide Zelllinien wurden sechs dieser Inkubations-Versuche unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführt (Tab. 6.1 Anhang). Um den Einfluss von Zufallsfehlern zu vermindern, wurden die resultierenden Werte gemittelt.

Im Anschluss daran wurde eine Wachstumskurve mit den innerhalb des Inkubations-Versuches täglich ermittelten Zellzahlen bestimmt. Auf diese Weise war der Einfluss der Substanzen auf das Zellwachstum nachvollziehbar und zum anderen konnten eine durch zu hohe Zelldichte verursachte Wachstumshemmungen erkannt und in die Überlegungen einbezogen werden (Kap.2.2.2.).

In dem Experiment wurden die Zelllinien T-47-D und BT-474 mit 50 ng EGF und 20 ng TGF α für 96 h inkubiert. Die Dosis für EGF wurde aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Inkubationsversuche verschiedener EGF-Konzentrationen gewählt.

50 ng EGF zeigten unter den verwendeten 3 Konzentrationen den deutlichsten Effekt auf den ErbB4-mRNA-Gehalt (Kap.: 3.4.2.1.). Es wurde wieder eine Kontrollkultur mitgeführt und der Quotient Q2 gebildet (Kap.:3.4.2.1.).

Der mRNA-Gehalt der untersuchten drei ErbB-Rezeptoren wurde jeweils nach 24, 72 und 96 h gemessen und nach einer Mittelung der Ergebnisse mit dem ebenfalls gemittelten mRNA-Level der Kontroll-Kultur, welche mit keiner Substanz inkubiert war, ins Verhältnis gesetzt (Kap.: 2.4.).

Die jeweils mitbestimmten Aktinwerte wurden mit dem jeweils gemessenen ErbB-mRNA-Gehalt ins Verhältnis gesetzt (ErbB-mRNA-Gehalt/Aktin-mRNA-Gehalt), so dass die Proben auch hier wieder auf einem vergleichbaren Niveau betrachtet werden konnten (Kap.: 2.4.2.).

Gleichzeitig wurde die Zellzahl nach 24, 72, 120, und 144 h bestimmt und gemittelt in einer Wachstumskurve aufgetragen (Kap.: 2.2.2.).

Für die nachfolgend beschriebenen Inkubationsversuche erfolgten in der gleichen Vorgehensweise .

3.4.2.2.1. T-47-D

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um 18% erhöht. Nach 72 h war der ErbB4-mRNA-Level gegenüber der Kontroll-Kultur mit einer Erhöhung um 22% noch einmal leicht gestiegen. Allerdings zeigte er sich nach 72 h mit einer Verringerung um nur -1% wieder nahezu mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur gleich. Demnach waren unter der Inkubation mit 50 ng EGF im zeitlichen Verlauf keine deutlichen Veränderungen der ErbB4-Expression bei T-47-D zu beobachten.

Bei der Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich dagegen eine deutliche Anhebung des ErbB4-mRNA-Gehaltes um 86% gegenüber der Kontrollkultur. Diese wurde mit einer Erhöhung des ErbB4-mRNA-Gehaltes um 161% nach 72-stündiger Inkubation mit 20 ng TGF α noch deutlicher. Nach einer 96-stündigen Inkubation wurde ein weiterer Anstieg des ErbB4-mRNA-Gehaltes um 18% registriert.

Unter der Inkubation mit TGF α war also ein deutlicher Anstieg der ErbB4-Expression bei T-47-D zu beobachten, welche nach 72 Stunden ihren Peak erreichte (Abb.:3.7.)

ErbB1:Der ErbB1-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur mit einer äußerst geringen Reduktion um -5% weitgehend unbeeinflusst.

Auch nach einer 72-stündigen Inkubation war der ErbB1-mRNA-Level mit einer Verringerung um -11% kaum verändert. Ebenso war der ErbB1-mRNA-Gehalt nach einer 96ig-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur mit einer Reduktion um -16% nur geringfügig verändert. EGF übte demnach keinen deutlichen Einfluss auf die ErbB1-Expression bei T-47-D aus.

Bei der Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich der ErbB1-mRNA-Gehalt ebenfalls mit einer geringen Reduktion um -7% nach 24 h, einer minimalen Erhöhung um 3% nach 72 h und einer leichten Verringerung um -6% nach 96 h ebenfalls ohne deutliche Veränderungen gegenüber der Kontroll-Kultur.

Somit bewirkte auch die Inkubation von T-47-D mit TGF α keine nennenswerten Veränderungen der ErbB1-Expression (Abb.: 3.8).

Zwei Werte konnten wegen fehlerhafter Messungen in die Ergebnisse des Inkubationsversuches bezüglich der ErbB1-Expression von T-47-D nicht mit einbezogen werden.

ErbB2: Der ErbB2-mRNA-Gehalt war nach einer 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB2-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur mit einer geringen Erhöhung um 9%, kaum verändert. Auch nach 72 h zeigte sich nur eine geringe Anhebung um 10%. Nach einer 96ig-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF war der ErbB2-mRNA-Gehalt gegenüber dem ErbB2-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur mit einer nicht nennenswerten Erhöhung um 6% so gut wie nicht verändert.

Somit erwies sich die Inkubation mit EGF auch auf die ErbB2-Expression ohne deutlichen Einfluss.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich eine leichte Erhöhung des ErbB2-mRNA-Gehaltes um 23%. Diese war jedoch nach einer Inkubationszeit von 72 h mit einer leichten Verringerung des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -6% nicht mehr nachweisbar. Nach 96 h konnte ebenfalls nur eine sehr geringe Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -9% gegenüber der Kontroll-Kultur beobachtet werden.

So bewirkte auch die Inkubation mit TGF α keine deutliche Änderung der ErbB2-Expression (Abb.: 3.9.).

Die genannten Ergebnisse sind in Tab. 3.32. dargestellt.

Tab.: 3.32.

T-47-D		Arbitrary Units im Verhältnis		
Rezeptor	Inkubationszeit	o.S. inkubationsfrei	o.S. 50 ng EGF	o.S. 20 ng TGF α
ErbB4	24 h	1	1,18	1,86
	72 h	1	1,23	2,61
	96 h	1	0,99	1,18
ErbB1	24 h	1	0,95	0,93
	72 h	1	0,89	1,03
	96 h	1	0,83	0,93
ErbB2	24 h	1	1,09	1,23
	72 h	1	1,10	0,94
	96 h	1	1,06	0,91

3.4.2.2.2. BT-747

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -20% reduziert. Nach einer 72-stündigen Inkubation war ebenfalls eine Reduktion des ErbB4-mRNA-Levels um -21% und nach 96 h um -34% nachzuweisen.

Es konnte bei dieser Zelllinie demnach durch die Einwirkung von EGF tendenziell eine Erniedrigung der ErbB4-Expression beobachtet werden.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich im Gegensatz zu T-47-D eine Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes um -22%. Nach 72 h war im Gegensatz zu T-47-D eine deutliche Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes um -41% erkennbar. Ebenso konnte nach 96 h eine Senkung des ErbB4-mRNA-Gehaltes um -37% beobachtet werden. Also war hier eine zu den Ergebnissen von T-47-D eindeutig gegenläufige Tendenz bezüglich der Beeinflussung der ErbB4-Expression durch TGF α festzustellen.

Hier kam es zu einer Reduktion des ErbB4-mRNA-Levels (Abb.: 3.7.).

ErbB1: Der ErbB1-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -14% erniedrigt. Bei einer 72-stündigen Inkubation blieb der ErbB1-mRNA-Level jedoch mit einer Anhebung um nur 2% gegenüber der Kontroll-Kultur nahezu gleich. Auch nach 96 h war keine Veränderung des ErbB1-mRNA-Gehaltes gegenüber der Kontroll-Kultur zu beobachten. Demnach hatte die Inkubation von BT-474 mit EGF keinen nachweisbaren Effekt auf die ErbB1-Expression.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich mit einer Erhöhung des ErbB1-mRNA-Gehaltes um nur 4% nahezu keine Veränderung gegenüber der Kontroll-Kultur.

Nach 72 h war eine Erhöhung des ErbB1-mRNA-Gehaltes um 13% zu beobachten. Nach 96 h zeigte sich der ErbB1-mRNA-Gehalt mit einer leichten Anhebung um 4% ebenfalls vergleichbar.

Somit bewirkte die Inkubation von BT-474 mit TGF α ebenfalls keine Veränderung des ErbB1-mRNA-Levels (Abb.: 3.8.).

ErbB2: Der ErbB2-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 50 ng EGF gegenüber dem ErbB2-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -18% reduziert. Nach 72 h war ebenfalls eine Reduktion des ErbB2-mRNA-Levels um -15% und nach 96 um -29% zu beobachten. Die Inkubation von BT-474 mit EGF hatte demnach tendenziell eher einen reduzierenden Effekt auf die ErbB2-Expression.

Auch bei der 24-stündigen Inkubation mit 20 ng TGF α zeigte sich eine Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -14%. Die gleiche Wirkung erzielte eine 72-stündige Inkubation mit einer Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -20%. Nach 96 h kam es ebenfalls zur Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -28%. Somit erwies sich auch TGF α interessanterweise eher als reduzierender Faktor für die ErbB2-Expression bei BT-474 (Abb.: 3.9.).

Die genannten Ergebnisse sind in Tab. 3.33. dargestellt.

Tab.: 3.33.

BT-474		Arbitrary Units im Verhältnis		
Rezeptor	Inkubation szeit	o.S. Inkubationsfrei	o.S. 50 ng EGF	o.S. 20 ng TGF α
ErbB4	24 h	1	0,80	0,78
	72 h	1	0,79	0,59
	96 h	1	0,66	0,63
ErbB1	24 h	1	0,86	1,04
	72 h	1	1,02	1,13
	96 h	1	1	1,04
ErbB2	24 h	1	0,82	0,86
	72 h	1	0,85	0,80
	96 h	1	0,71	0,72

3.4.2.3. Die Wachstumskurven beider Zelllinien unter EGF und TGF α

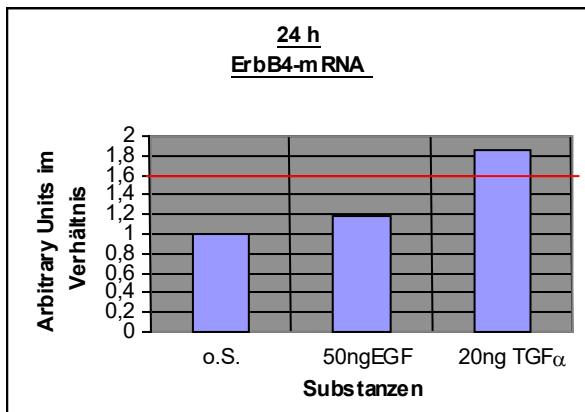
Innerhalb der Inkubationsversuche wurden für beide Zelllinien Wachstumskurven ermittelt. Mit Hilfe dieser sollte neben einer Wachstumskontrolle auch einen Bezug zu dem klinischen Parameter der Tumorzellproliferation in Abhängigkeit von den verwendeten Substanzen hergestellt werden.

Hier zeigten sich anhand der Zellwachstumsraten keine wesentlichen Veränderungen unter der Inkubation mit EGF und TGF α gegenüber der Kontrollkultur.

Die Zellproliferation und somit das Tumorzellwachstum wurden weder durch EGF noch durch TGF α sicher beeinflusst. Eine Stimulation der Zelldifferenzierung, wie sie unter EGF und TGF α auch beschrieben wurde, ist jedoch durchaus denkbar (Abb.: 3.10).

Der ErbB4-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 50 ng EGF und 20 ng TGF α im zeitlichen Verlauf

T-47-D



BT-474

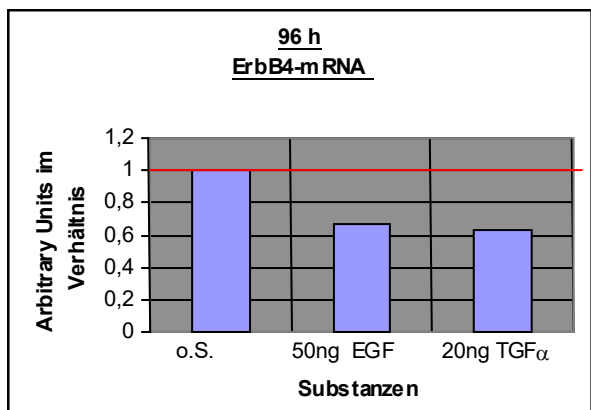
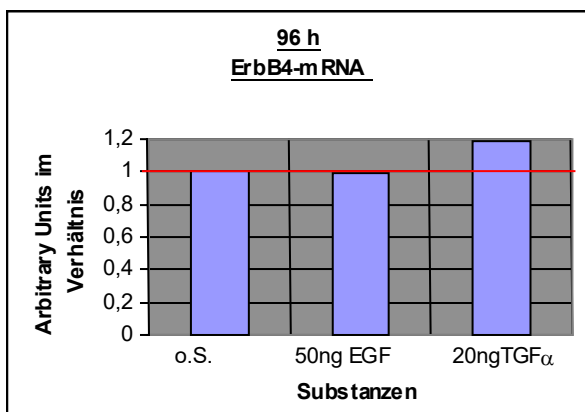
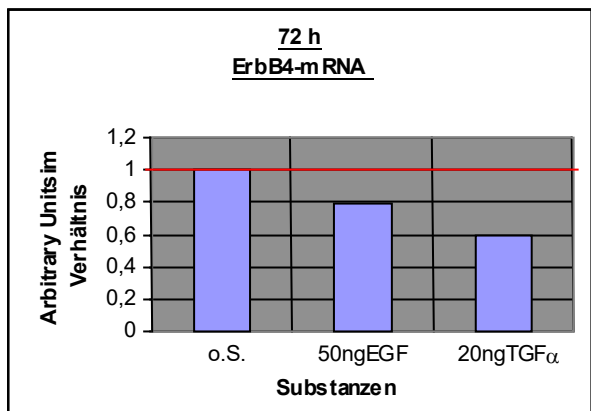
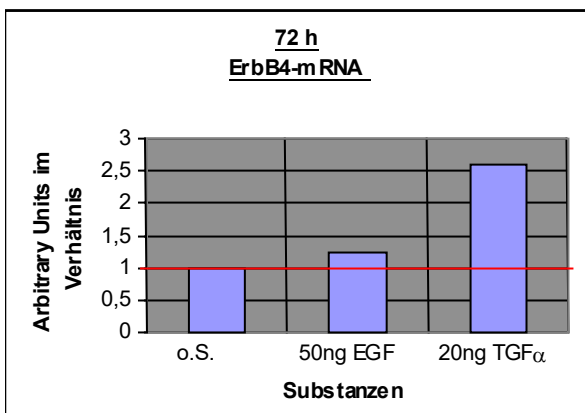
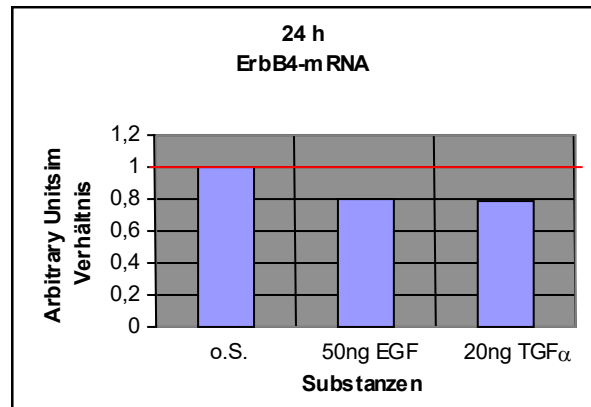
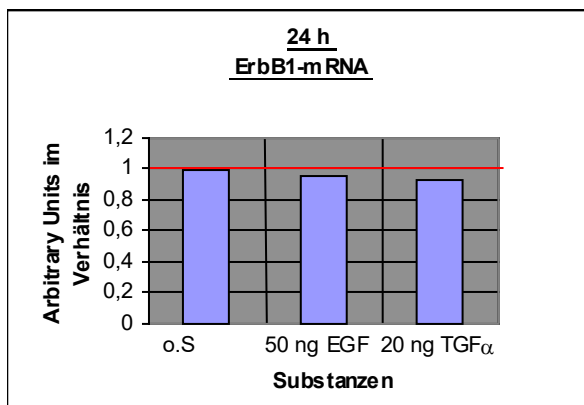


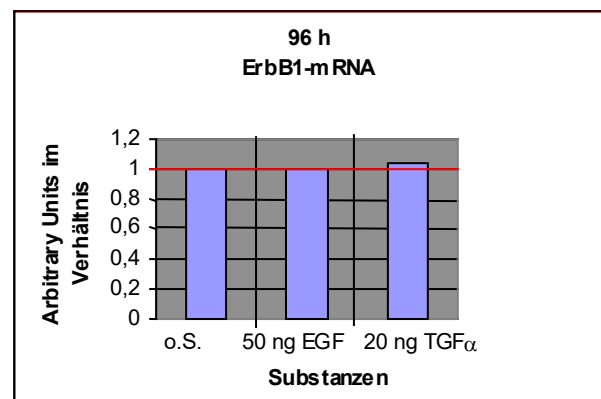
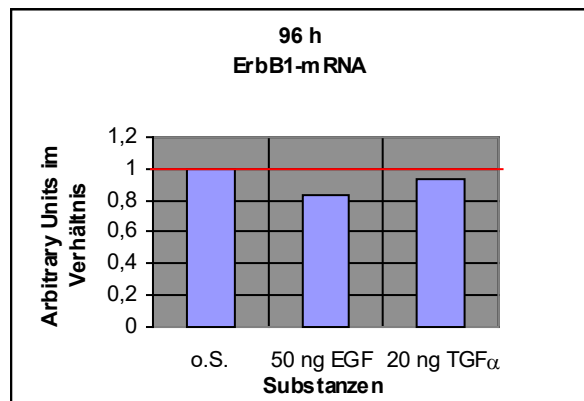
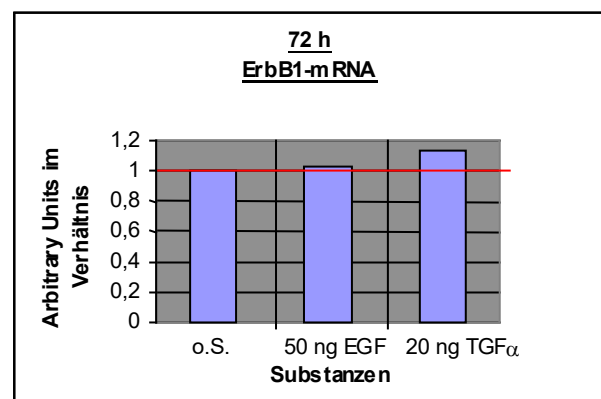
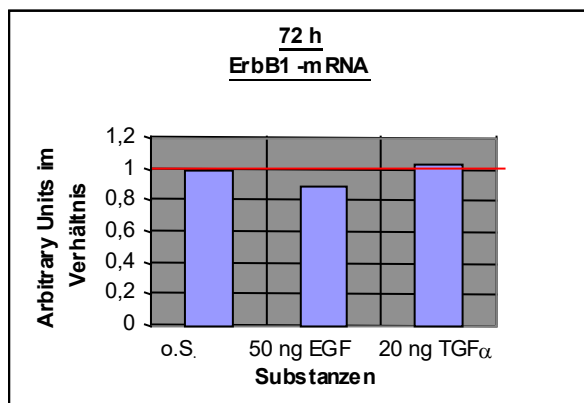
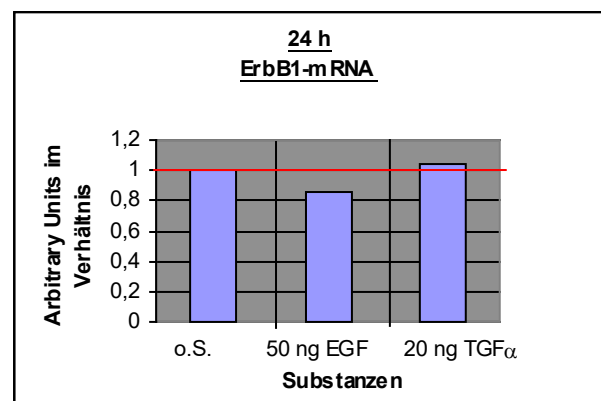
Abb.: 3.8.

Der ErbB1-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 50 ng EGF und 20 ng TGF α im zeitlichen Verlauf

T-47-D

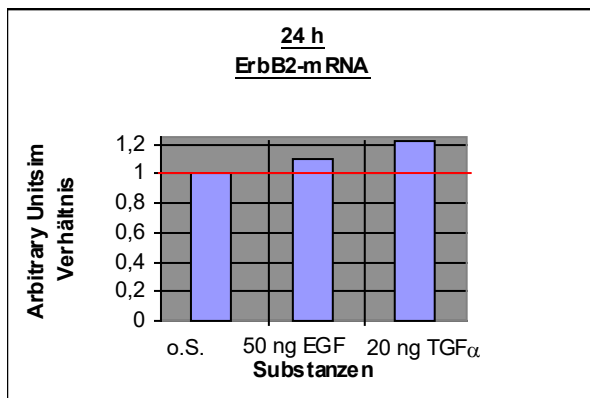


BT-474



Der ErbB2-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 50 ng EGF und 20 ng TGF α im zeitlichen Verlauf

T-47-D



BT-474

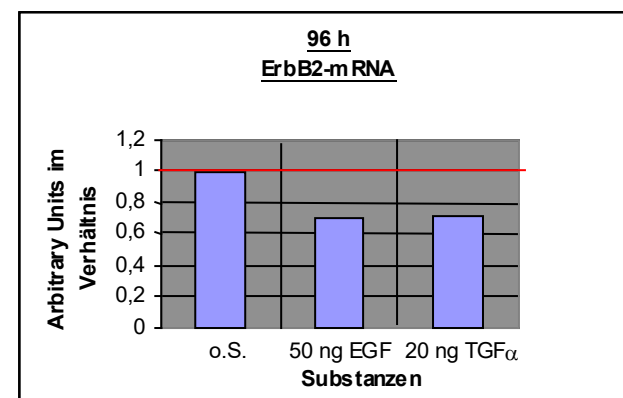
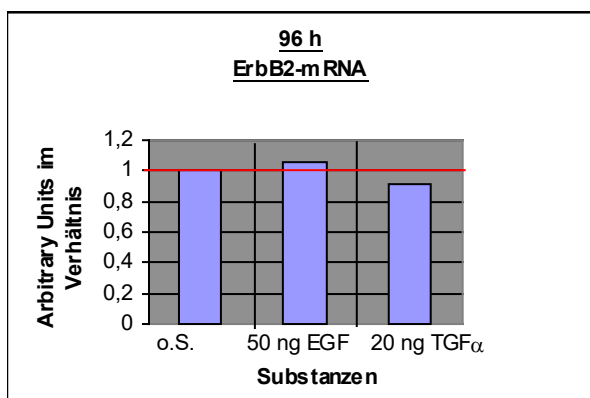
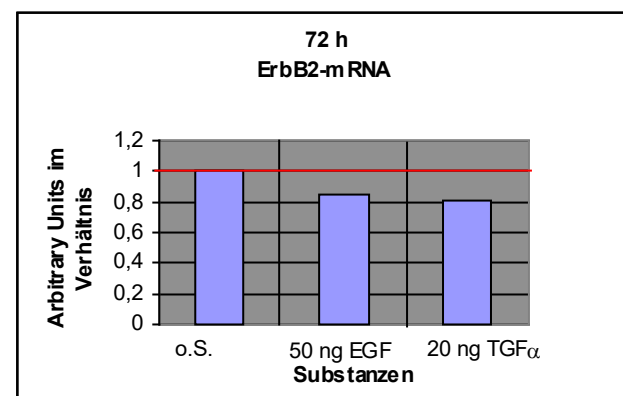
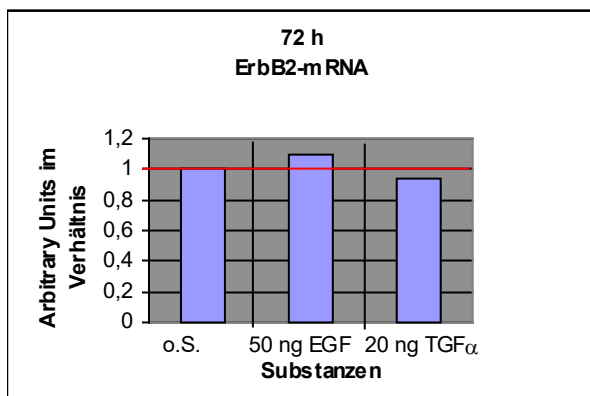
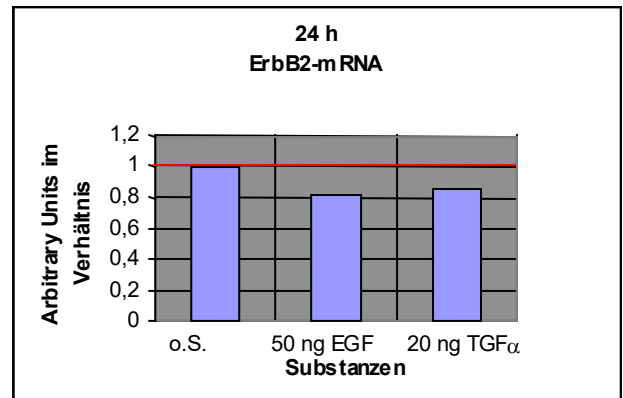
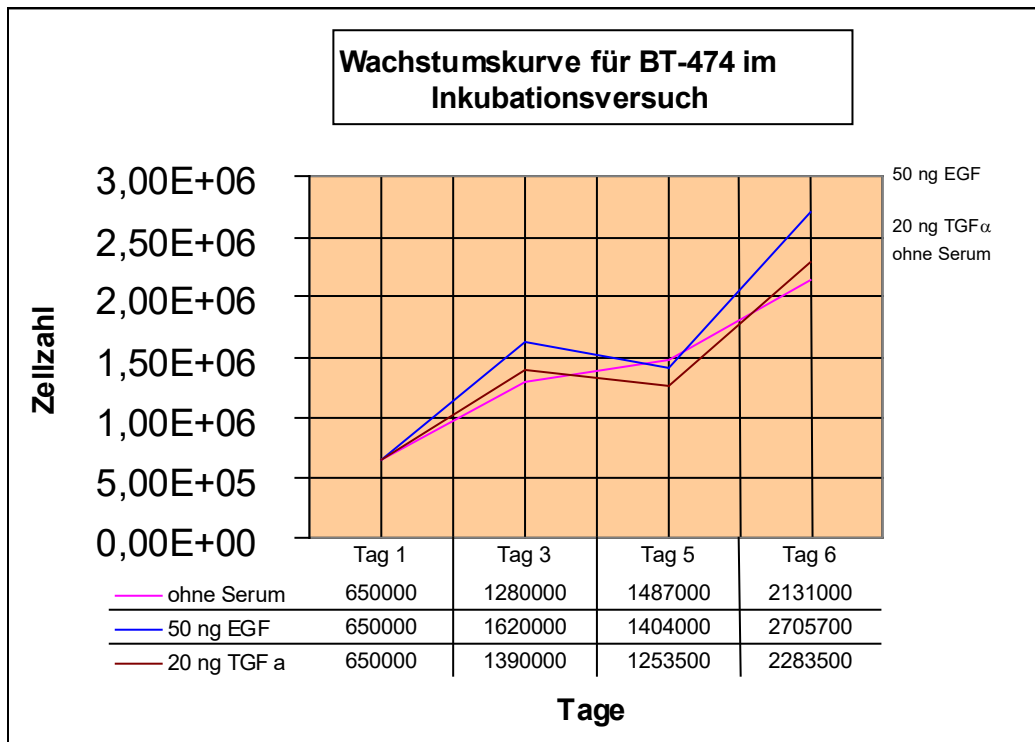
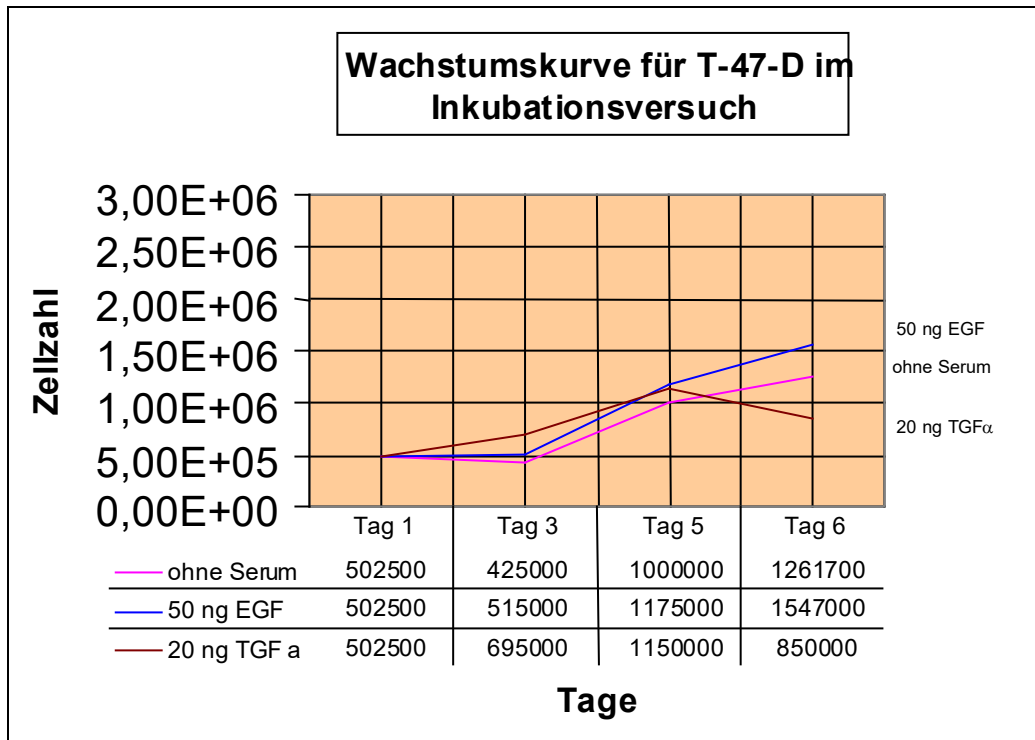


Abb.: 3.10.

Wachstumskurven von T-47-D und BT-474 unter der Inkubation mit 50ng EGF und 20 ng TGF α über 6 Tage im Vergleich



3.4.3. Die ErbB-Expression unter dem Einfluss von Suramin

Beide Zelllinien T-47-D und BT-474 wurden für 96 h mit 10 µg und 100 µg mit dem unspezifischen Inhibitor Suramin inkubiert. Dies geschah unter den gleichen Bedingungen, wie bei dem vorangegangenen, ebenfalls 96-stündigen Inkubationsversuch mit EGF und TGFα beschrieben. Jeweils insgesamt 6 Inkubationsversuche wurden durchgeführt und deren Ergebnisse gemittelt. Allerdings wurde bei diesen Versuchen und der zugehörigen Kontrollkultur serumhaltiges Medium verwendet.

Abschließend wurde der Quotient Q2 gebildet (Kap.: 3.4.2.1.).

3.4.3.1. T-47-D

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin mit einer Anhebung gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um nur 1% nahezu unverändert. Nach 72 h zeigte sich eine deutlichere Reduktion um -26%.

Dieser Effekt schien sich jedoch bei der 96-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin mit einer Anhebung des ErbB4-mRNA-Levels um 20% gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur ins Gegenteil zu verkehren. Diese Ergebnisse spiegeln gegenläufige Tendenzen wieder. Die Veränderungen sind jedoch nicht so deutlich, dass man von einem klaren zeitabhängigen Effekt von 10 µg Suramin auf die ErbB4-Expression ausgehen könnte. Die Daten sprechen eher dafür, dass Suramin keine Veränderung der ErbB4-Expression bewirkt.

Bei der Inkubation mit 100 µg Suramin zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Der ErbB4-mRNA-Gehalt veränderte sich mit einer Erhöhung um 9% nach 24 h so gut wie gar nicht. Nach 72 h kam es hingegen mit einer Verringerung des ErbB4-mRNA-Gehaltes um -28% zu einer Reduktion und nach 96 h mit einer Anhebung des ErbB4-mRNA-Gehaltes um 17% zu einer Erhöhung. Auch in dieser Dosis zeigte Suramin eine uneinheitliche Wirkung. Jedoch wurde die schon bei 10 µg beobachtete Tendenz einer zeitabhängigen Reduktion und anschließenden Erhöhung der ErbB4-Expression durch Suramin bestätigt. Eine deutliche Einwirkung von Suramin auf die ErbB4-Expression lässt sich jedoch auch hieraus nicht ableiten (Abb.: 3.11.).

ErbB1: Der ErbB1-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um den Betrag von -33% reduziert. Nach 72 h war diese Reduktion mit einer Verringerung um -1% jedoch kaum noch nachweisbar. Allerdings zeigte sich dieser Effekt nach einer 96-stündigen Inkubation mit einer Reduktion gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -44% erneut. Es stellte sich demnach heraus, dass Suramin in dieser Konzentration tendenziell eher eine Reduktion der ErbB1-Expression bewirkte. Da dieser Effekt jedoch nach 72 h nicht nachweisbar war, kann von nicht von einer klaren Beeinflussung der ErbB1-Expression durch Suramin gesprochen werden.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 100 µg Suramin zeigte sich eine deutliche Reduktion des ErbB1-mRNA-Gehaltes um -49%. Diese war mit einer Verringerung um -35% auch noch nach 72 h nachweisbar. Im Gegensatz dazu war dieser Effekt nach einer 72-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin nicht mehr sichtbar. Allerdings war in diesem Fall nach 96 h mit einer leichten Erhöhung um 9% keine deutliche Veränderung mehr zu beobachten. Somit erwies sich die Wirkung von Suramin auf die ErbB1-Expression auch in dieser Dosis als tendenziell reduzierend.

Aufgrund der starken Schwankungen lässt sich hier jedoch unter Einbeziehung der Ergebnisse der Inkubation mit 10 µg Suramin keine klare Aussage bezüglich der Wirkung von Suramin auf die ErbB1-Expression treffen (Abb.: 3.12.).

ErbB2: Der ErbB2-mRNA-Gehalt bei der 24-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin war gegenüber dem ErbB2-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -18% leicht erniedrigt. Nach 72 h und 96 h zeigten sich jedoch mit einer Reduktion um nur -4% und einer Erhöhung um nur 1% gegenüber der Kontroll-Kultur effektiv keine Veränderungen mehr. Suramin scheint demnach in dieser Konzentration keinen Effekt auf die ErbB2-Expression zu haben.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 100 µg Suramin zeigte sich - mit einer leichten Verringerung des ErbB2-mRNA-Gehaltes um -11% - ebenfalls kaum eine Veränderung gegenüber der Kontroll-Kultur. Nach 72 h war hingegen eine deutlichere Reduktion um -25% nachweisbar. Dieser Effekt war allerdings nach 96 h mit einer vernachlässigbar geringen Erhöhung des ErbB2-mRNA-Gehaltes um 5% nicht mehr beobachtbar. Betrachtet

man die Ergebnisse der Inkubation beider Konzentrationen Suramin, zeigt sich tendenziell eine reduzierende Wirkung auf die ErbB2-Expression. Sie stellt sich jedoch nicht deutlich genug dar, um einen klaren Zusammenhang annehmen zu können (Abb.: 3.13.).

Die genannten Ergebnisse sind in Tab. 3.34. dargestellt.

Tab.: 3.34.

T-47-D Arbitrary Units im Verhältnis				
Rezeptor	Inkubationszeit	m.S. Inkubationsfrei	m.S. 10ug Suramin	m.S. 100ug Suramin
ErbB4	24 h	1	1,01	1,09
	72 h	1	0,74	0,72
	96 h	1	1,20	1,17
ErbB1	24 h	1	0,67	0,51
	72 h	1	0,99	0,75
	96 h	1	0,56	1,09
ErbB2	24 h	1	0,82	0,89
	72 h	1	0,96	0,75
	96 h	1	1,01	1,05

3.4.3.2. BT-474

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt veränderte sich sowohl bei der 24- als auch 72-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin gegenüber der Kontroll-Kultur nicht. Nach 72 h zeigte sich jedoch eine Reduktion um -20%. Gegenüber dem entsprechenden Versuch bei T-47-D zeigten sich für BT-474 bei dieser Suramin-Konzentration keine deutlichen Veränderungen der ErbB4-Expression, am ehesten noch eine tendenziell reduzierende Wirkung.

Bei der Inkubation mit 100 µg Suramin zeigten sich jedoch erneut - je nach Inkubationszeit - gegensätzliche Ergebnisse. So war nach 24 h eine Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes um -21% zu beobachten, nach 72 h hingegen eine Erhöhung um 19%.

Nach einer 96-stündigen Inkubation mit 100 µg Suramin konnte hingegen wieder eine Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes gegenüber der Kontroll-Kultur um -33% festgestellt werden. Somit bewirkte die Inkubation von BT-474 mit Suramin in höherer Dosis - wie auch schon bei T-47-D - gegensätzliche Veränderungen der ErbB4-Expression, allerdings in einer anderen zeitlichen Abhängigkeit.

Eine zeitliche Gesetzmäßigkeit lässt sich auch aus diesen Daten nicht klar erkennen, jedoch unterstützen diese Ergebnisse die uneinheitliche Wirkung von Suramin auf die ErbB-4-Expression (Abb.: 3.11.).

ErbB1: Der ErbB1-mRNA-Gehalt war bei der 24-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin gegenüber dem ErbB1-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -12% leicht reduziert. Diese leichte Reduktion war auch nach 72 h mit einer Verringerung um -13% noch nachweisbar. Nach 96 h war mit einer Verringerung um nur -5% keine nennenswerte Veränderung des ErbB1-mRNA-Levels gegenüber der Kontroll-Kultur mehr zu beobachten. Suramin scheint demnach in dieser Konzentration keine deutliche Veränderung in der ErbB1-Expression zu bewirken.

Bei der 24-stündigen Inkubation mit 100 µg Suramin hingegen zeigte sich eine deutliche Erhöhung des ErbB1-mRNA-Gehaltes um 51%.

Nach 72 h und 96 h waren jedoch mit einer Reduktion des ErbB1-mRNA-Gehaltes um -17% und um -12% keine deutlichen Veränderungen mehr nachweisbar. Somit schien Suramin in dieser höheren Konzentration kurzzeitig einen stimulierenden Effekt auf die ErbB4-Expression auszuüben. Auch dies unterstreicht die Fähigkeit zu unterschiedlichen Wirkungsweisen von Suramin (Abb.: 3.12.).

ErbB2: Der ErbB2-mRNA-Gehalt war bei einer 24-stündigen Inkubation mit 10 µg Suramin gegenüber dem ErbB2-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -17% leicht reduziert. Nach 72 h zeigte sich ebenfalls eine leichte Reduktion um -21%. Nach einer 96-stündigen Inkubation war hingegen eine leichte Erhöhung des ErbB2-mRNA-Gehaltes um 19% zu beobachten. Insgesamt zeigte die Inkubation mit 10 µg keinen deutlichen Effekt auf die ErbB2-Expression

Ebenso waren bei einer Inkubation mit 100 µg Suramin mit einer -12%, -8% und -6%igen Reduktion nach jeweils 24, 72, und 96 h keine deutlichen Veränderungen des ErbB2-mRNA-Gehaltes festzustellen. Suramin scheint demnach bei BT-474 - im Gegensatz zu T-47-D, wo eine reduzierende Tendenz beobachtet werden konnte - keine Auswirkung auf die ErbB2-Expression zu haben (Abb.: 3.13.).

Die genannten Ergebnisse sind in Tab. 3.35. dargestellt.

Tab.: 3.35.

BT-474 Arbitrary Units im Verhältnis				
Rezeptor	Inkubationszeit	m.S. inkubationsfrei	m.S. 10ug Suramin	m.S. 100ug Suramin
ErbB4	24 h	1	1	0,79
	72 h	1	1	1,19
	96 h	1	0,80	0,67
ErbB1	24 h	1	0,88	1,51
	72 h	1	0,87	0,83
	96 h	1	0,95	0,82
ErbB2	24 h	1	0,83	0,88
	72 h	1	0,79	0,92
	96 h	1	1,19	0,94

3.4.3.3. Die Wachstumskurven beider Zelllinien unter Suramin

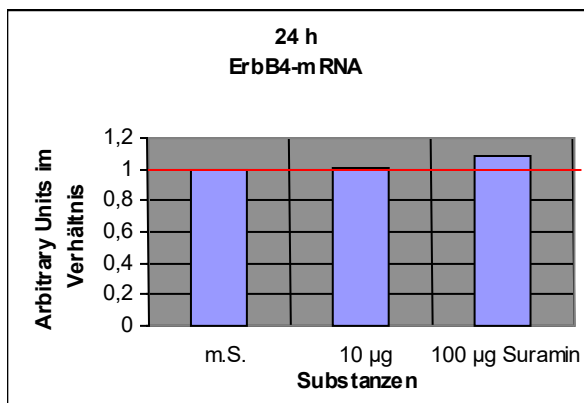
Innerhalb dieser Inkubationsversuche mit Suramin wurden für beide Zelllinien wieder Wachstumskurven ermittelt. Mit Hilfe dieser sollte auch hier neben der Wachstumskontrolle ein Bezug zu dem klinischen Parameter der Tumorzellproliferation in Abhängigkeit von den verwendeten Konzentrationen an Suramin hergestellt werden.

Für T-47-D konnte vor allem unter einer Konzentration von 100 µg Suramin eine deutliche Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. Das Zellwachstum war ohne Suramin doppelt so stark wie unter 100 µg Suramin.

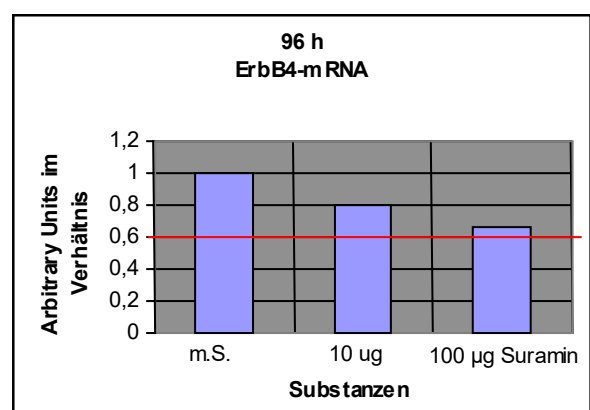
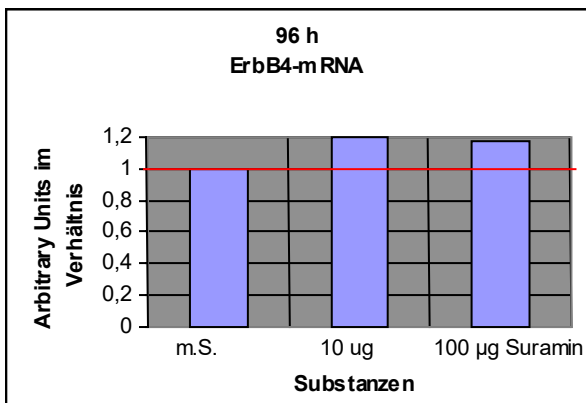
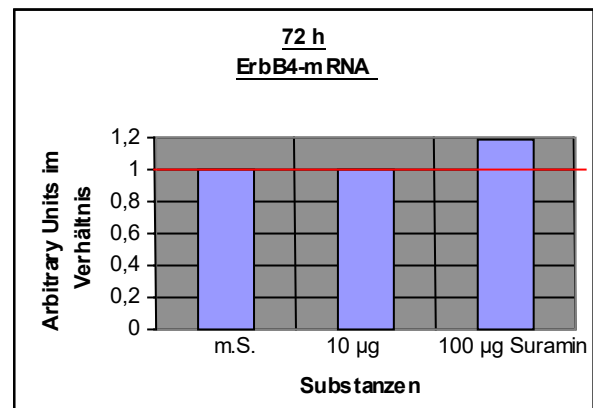
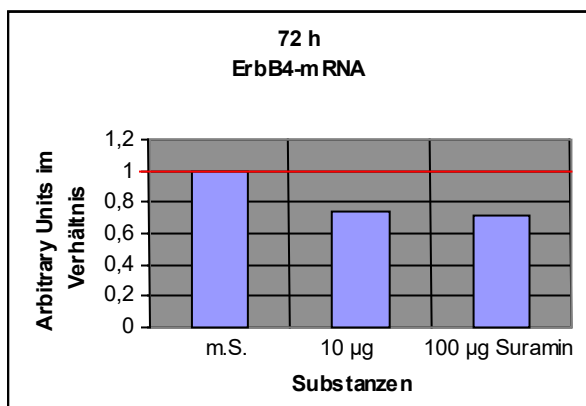
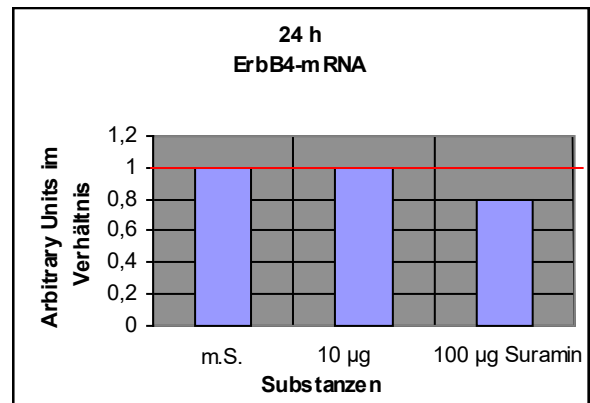
BT-474 zeigte sich dem gegenüber resistenter. Hier konnte unter beiden Suramin-Konzentrationen keine deutliche Veränderung des Zellwachstums gegenüber der Kontrollkultur beobachtet werden. Die Zellproliferation und somit das Tumorzellwachstum von BT-474 blieben demnach - im Gegensatz zu T-47-D - unbeeinflusst. Darüber hinaus wies BT-474 eine generell geringere Wachstumsrate als T-47-D unter gleichen Bedingungen auf (Abb.: 3.14.).

Der ErbB4-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 10 ug und 100 ug Suramin im zeitlichen Verlauf

T-47-D

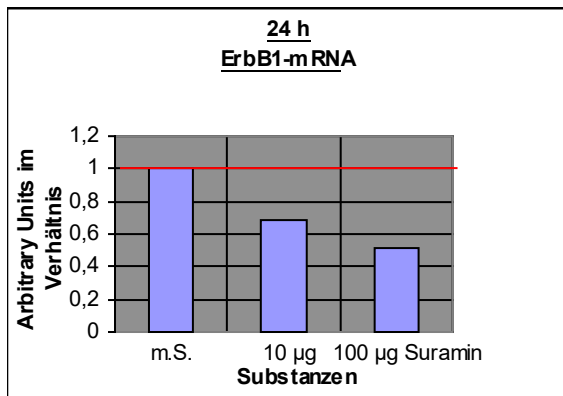


BT-474

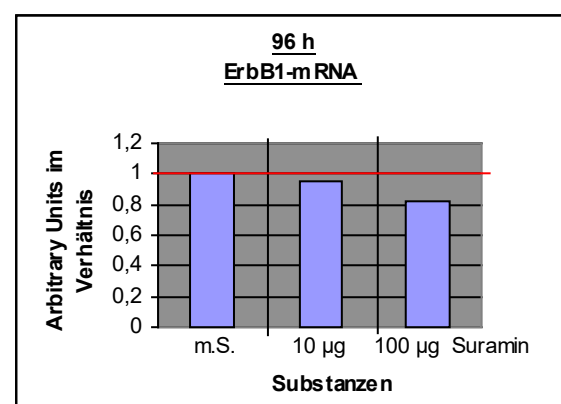
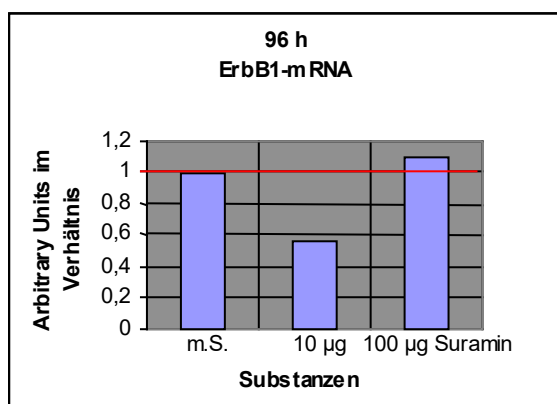
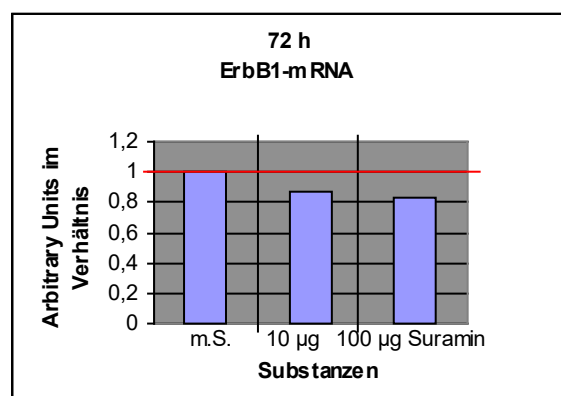
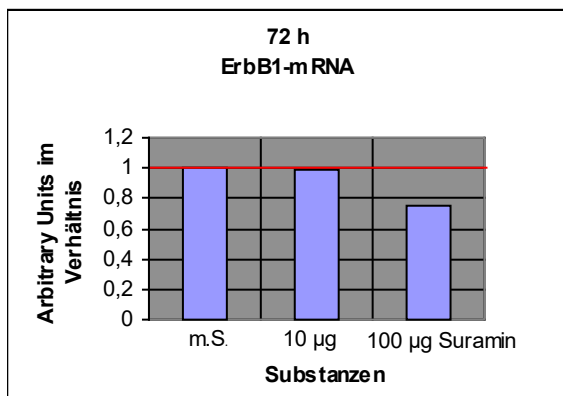
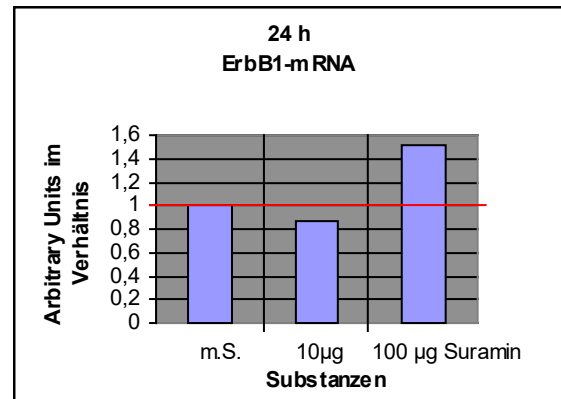


Der ErbB1-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 10 µg und 100 µg Suramin im zeitlichen Verlauf

T-47-D

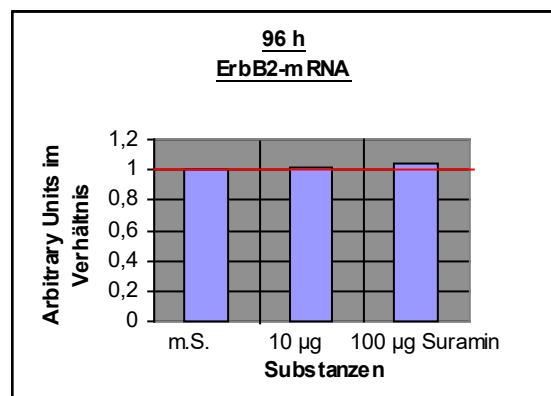
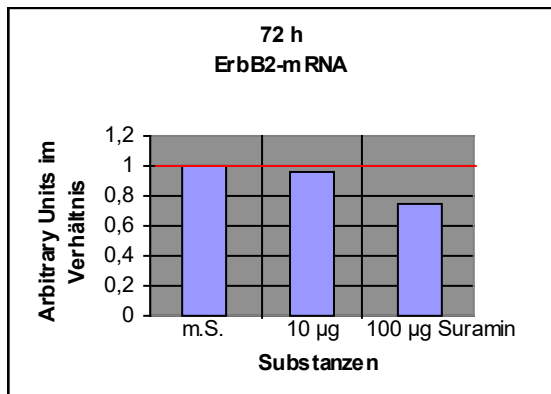
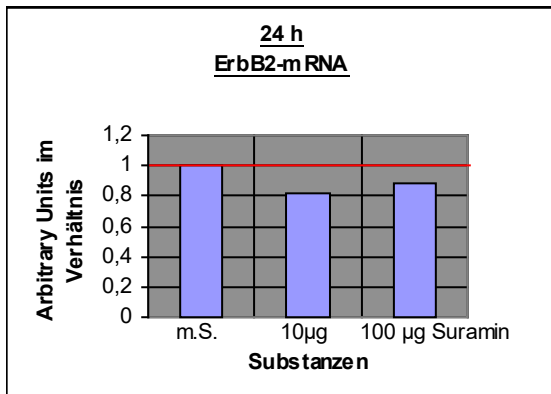


BT-474

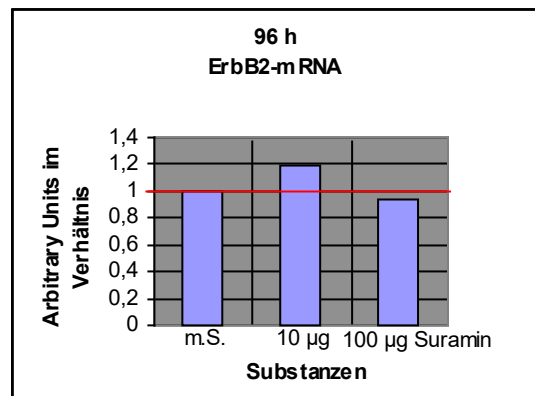
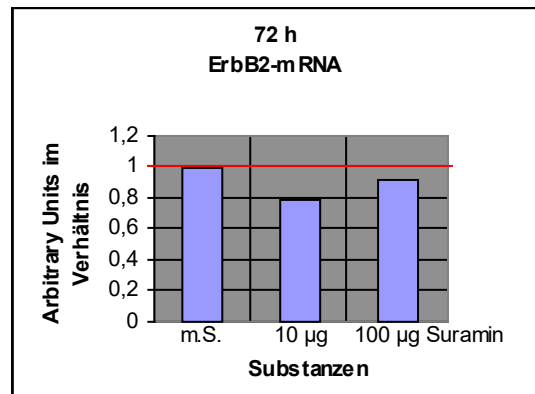
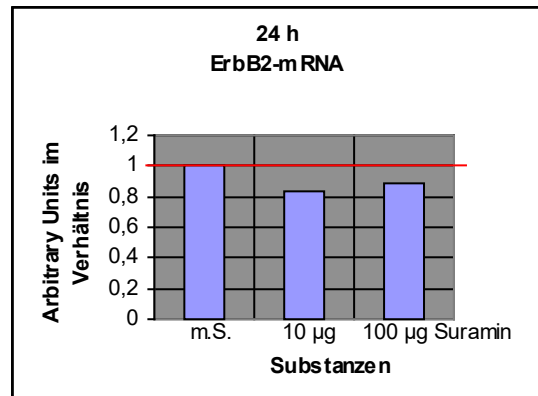


Der ErbB2-mRNA-Gehalt im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474
mit 10 µg und 100 µg Suramin im zeitlichen Verlauf

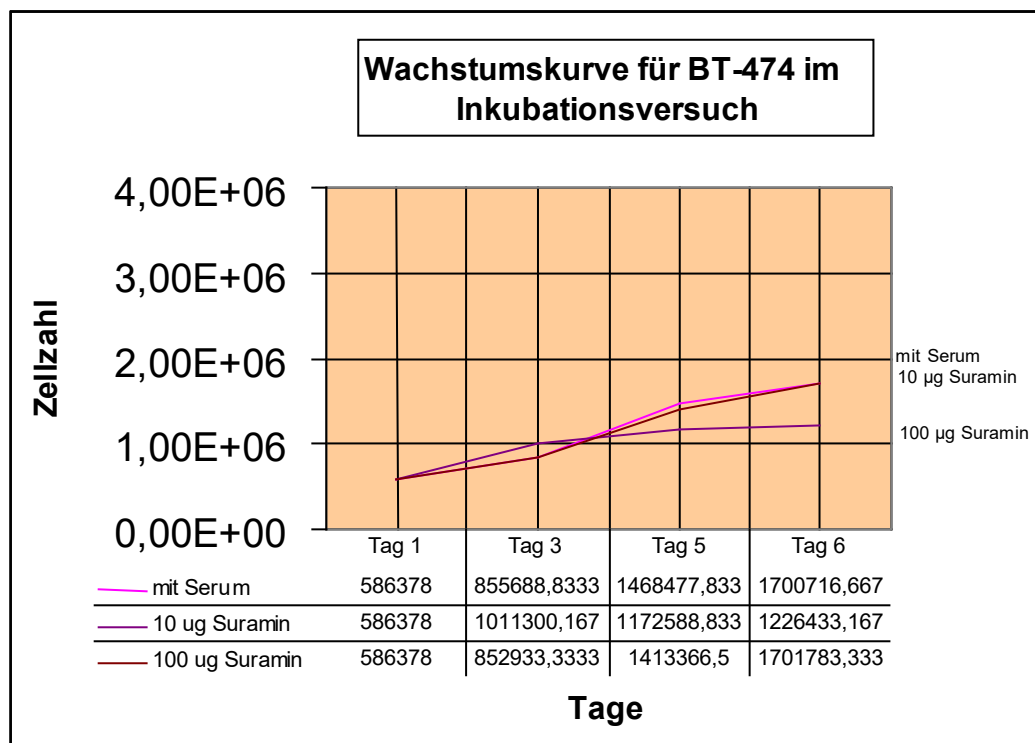
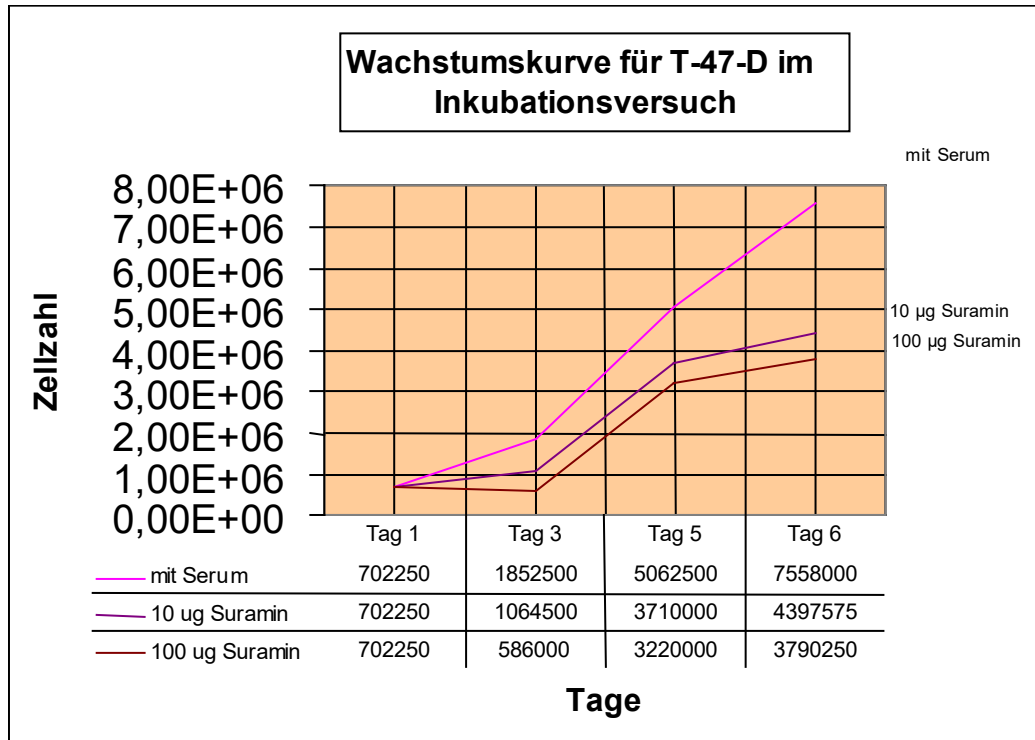
T-47-D



BT-474



Wachstumskurven von T-47-D und BT-474 unter der Inkubation mit 10ug und 100ug Suramin über 6 Tage im Vergleich



3.4.4. Die ErbB-Expression unter dem Einfluss eines Metallo-Proteinase-Hemmers (CGS)

Beide Zelllinien T-47-D und BT-474 wurden für 24 h mit 1 µM CGS inkubiert. Dies geschah unter den gleichen Bedingungen des ebenfalls 24-stündigen Inkubationsversuches mit verschiedenen EGF-Konzentrationen (Kap.: 3.4.2.1.).

Es wurde ebenfalls wieder die Kontrollkultur mitgeführt und der Quotient Q2 gebildet (Kap.: 3.4.2.1.).

3.4.4.1. T-47-D

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt war nach einer 24-stündigen Inkubation mit CGS interessanterweise gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um 81% erhöht und damit fast doppelt so hoch.

ErbB1: Der ErbB1-mRNA-Gehalt zeigte bei einer 24-stündigen Inkubation mit CGS mit einer leichten Erhöhung um nur 12% dagegen kaum eine Veränderung.

ErbB2: Für den ErbB2-mRNA-Gehalt war - wie auch beim ErbB4 - eine allerdings geringere Erhöhung um 31% zu beobachten.

Demnach wirkte CGS bei T-47-D auf die ErbB4-Expression als auch auf die ErbB2-Expression eher stimulierend, während die ErbB1-Expression nahezu unverändert blieb (Tab.: 3.36., Abb.: 3.15.).

Tab.: 3.36.

Substanzen			
Rezeptor	Inkubationszeit	o.S	o.S.
			CGS
ErbB4	24 h	1	1,81
ErbB1	24 h	1	1,12
ErbB2	24 h	1	1,31

3.4.4.2. BT-474

ErbB4: Der ErbB4-mRNA-Gehalt war im Gegensatz zu T-47-D bei einer 24-stündigen Inkubation mit CGS gegenüber dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Kontroll-Kultur um -29% verringert.

ErbB1, ErbB2: Der ErbB1-mRNA-Gehalt als auch der ErbB2-mRNA-Gehalt zeigten mit einer Reduktion und einer Erhöhung jeweils um +/-12% des entsprechenden mRNA-Gehaltes kaum Veränderungen der Expression.

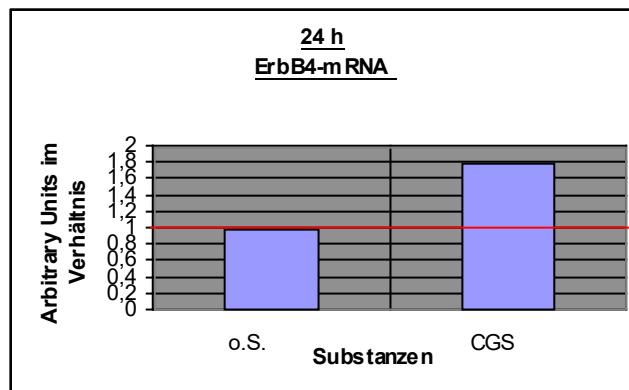
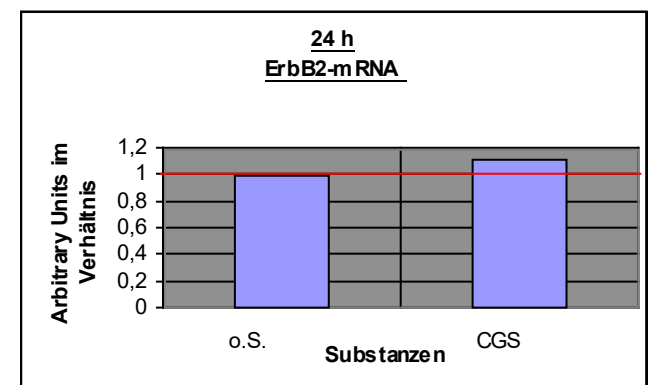
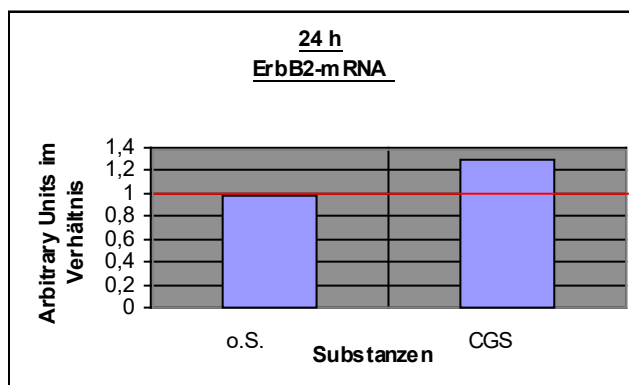
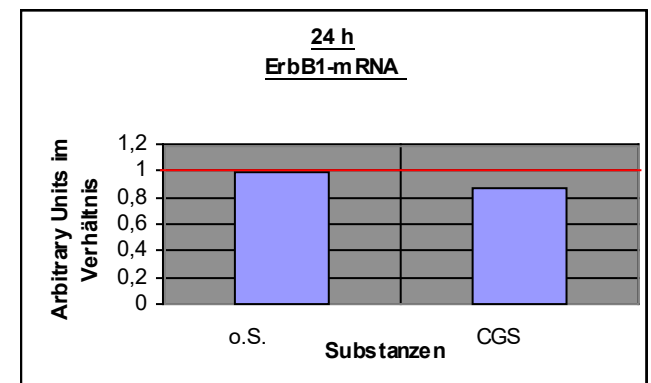
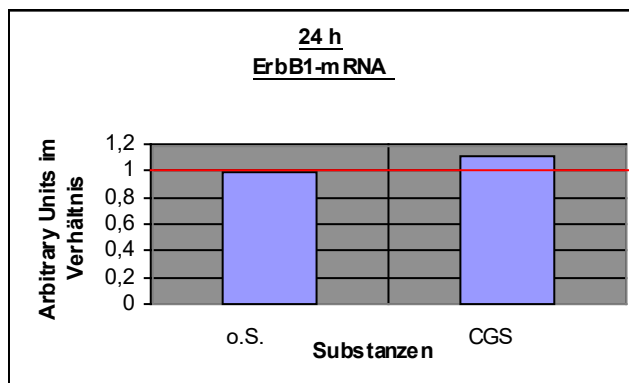
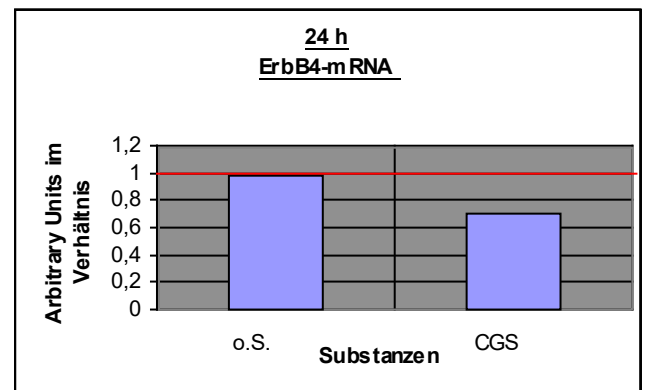
Es zeigte sich somit - im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Inkubation von T-47-D mit CGS - dass der MMP-Inhibitor bei BT-474 eher zu einer Verringerung der ErbB4-mRNA-Expression führte.

Bezüglich der ErbB1- oder ErbB2-Expression war hingegen bei BT-474 keine deutliche Veränderung zu beobachten (Tab 3.37., Abb.: 3.15.).

Tab.: 3.37.

		Substanzen	
Rezeptor	Inkubationszeit	o.S.	o.S.
			CGS
ErbB4	24 h	1	0,71
ErbB1	24 h	1	0,88
ErbB2	24 h	1	1,12

Der mRNA-Gehalt von ErbB4, ErbB1 und ErbB2 im Inkubationsversuch der Zelllinien T-47-D und BT-474 mit CGS über 24 h

T-47-D**BT-474**

4. DISKUSSION

In den letzten Jahren hat sich immer deutlicher gezeigt, dass die Familie der ErbB-Rezeptoren entscheidende Faktoren für die Entstehung wie auch Progression von verschiedenen Malignomen darstellen. Besonders bei Mammakarzinomen haben Mitglieder der ErbB-Familie, ErbB1 und ErbB2, inzwischen als Prognosefaktoren eine zunehmende Bedeutung. Ihre biologische Rolle bei der Entartung von Mammazellen ist allgemein anerkannt, während ihre Wertigkeit als Prognosefaktoren noch umstritten ist. Weiterhin konnten erste Erfolge bei Therapien mit Antikörpern gegen ErbB-Rezeptoren, insbesondere ErbB2, beschrieben werden.

Malignome, welche Mitglieder der ErbB-Familie überexprimieren, scheinen nicht nur prognostisch, sondern auch therapeutisch eine inzwischen eigenständige Untergruppe von Tumoren darzustellen, die immerhin etwa ein Viertel der Mammakarzinome ausmacht.

Dieser Gruppe von Tumoren - wie auch der Funktion von ErbB-Rezeptoren - gilt ein zunehmendes wissenschaftliches wie auch klinisches Interesse.

Es zeigte sich innerhalb vieler in den letzten Jahren durchgeführten Studien, dass die Interaktionen der ErbB-Rezeptoren um ein Vielfaches komplexer und vielfältiger sind, als man bisher annahm. Jeder Rezeptor scheint hierbei eine nicht unwichtige spezielle Funktion innerhalb der Signal-Transduktion auszuüben.

Der ErbB4-Rezeptor, einer der zuletzt entdeckten Mitglieder der ErbB-Familie, könnte hierbei gerade in der Regulation der Tumor-Progression eine wichtige Rolle spielen. Bisher gab es allerdings kaum Studien über die ErbB4-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien, welche diesen Rezeptor mit dem ErbB1- und dem ErbB2-Rezeptor korrelierten. Ebenso wurde das Verhalten des ErbB4-Rezeptors in primären Mammakarzinomen bisher kaum untersucht.

Eine besondere Eigenschaft, welche die Rezeptoren der ErbB-Familie auszeichnet, ist die Fähigkeit, in Homo- bzw. Heterodimeren funktionelle Einheiten zu bilden. Es scheint sogar so zu sein, dass verschiedene Ligand-Rezeptor-vermittelte Signale - z.B. solche, welche über die Wachstumsstimulation hinaus zur Transformation und damit Entartung der Zelle führen - einer vorherigen Heterodimerisation bedürfen.

Hinzu kommt, dass die Bildung von bestimmten Heterodimeren die Affinität des Liganden zum Rezeptor erhöhen und somit dessen Wirkung verstärken.

Wie in der Einleitung schon beschrieben, sind inzwischen verschiedene Heterodimer-Kombinationen bekannt. So vermag der Erb4-Rezeptor mit dem Erb2- und ErbB1-Rezeptor funktionell wichtige Heterodimere zu bilden. ErbB4-Homodimere sind ebenfalls als

weitere Kombination möglich. Durch beide Heterodimere vermag auch der ErbB4-Rezeptor über eine Liganden-Rezeptor-Interaktion auf die Tumorentwicklung Einfluss zu nehmen.

Aufgrund der vielfältigen Fragen, welche nach wie vor zum ErbB4-Rezeptor und seinen Interaktionen zu anderen Rezeptoren sowie zu inzwischen etablierten klinischen Prognose-Faktoren bestehen, erschien es wichtig, den ErbB4 in primären Mamma-Karzinomen und in Inkubationsversuchen mit Mamma-Karzinom-Zelllinien zu untersuchen.

Zunächst wurde der ErbB4-Gehalt in 36 intraoperativ gewonnenen invasiv duktalem Mammakarzinom-Gewebe-Proben bestimmt.

Hierbei konnte mittels PCR ein nachweisbarer ErbB4-mRNA-Gehalt bei 72% der untersuchten Tumoren festgestellt werden. In nahezu dreiviertel aller untersuchten Tumoren kann man also von einer ErbB4-Expression ausgehen.

Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den von Tang et al. 1999 ebenfalls vorgenommenen Untersuchungen der ErbB4-Expression in 50 primären Mamma-Karzinomen, in diesem Fall jedoch immunhistochemisch bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass bei einem vergleichbaren Prozentsatz der Tumoren (60%) ErbB4-Rezeptoren nachweisbar waren [95].

Dieser hohe Prozentsatz an Tumoren, welche ErbB4-Rezeptoren exprimieren, könnte darauf hindeuten, dass der ErbB4-Rezeptor bei der Tumorentwicklung benötigt wird.

Jedoch besagt dieser Prozentsatz nichts darüber aus, in welchem Anteil der Tumoren sich der ErbB4-mRNA-Gehalt im Laufe der Tumorentwicklung gegenüber dem Normalgewebe verändert hat. Hierzu wurde der ErbB4-mRNA-Gehalt eines jeden Tumors mit dem der angrenzenden nicht entarteten Resektionsrändern verglichen.

Es stellte sich heraus, dass der Gehalt bei 11 % der Tumoren gegenüber dem Normalgewebe deutlich, d.h. um mehr als das Zehnfache erhöht war. Eine derartige Überexpression kann unterschiedliche Ursachen haben.

Zum einen kann eine Gen-Amplifikation die Ursache für die Überexpression sein, zum anderen eine Veränderung des Genes selbst, durch eine Mutation oder durch toxische Substanzen verursacht. Diese molekularen Vorgänge wurden bisher jedoch für den ErbB4-Rezeptor kaum untersucht.

Umfangreiche Studien wurden bei ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomen und Malignomen des Ovars durchgeführt, bei denen generell ca. 20-30% dieser Tumoren

ErbB2 überexprimieren. Die Ursachen dieser Überexpression wurden hier im Gegensatz zum ErbB4-Rezeptor eingehend untersucht.

Bei 90 % der ErbB2-überexprimierenden Tumoren konnte die Gen-Amplifikation als auslösende Noxe für eben diese Überexpression identifiziert werden. Interessanterweise ist der ErbB2-Rezeptor vor allem bei einem großen Teil der dukalen Karzinome in situ überexprimiert [43] [75].

Allerdings ist ein erhöhter ErbB2-Level auch in Krebszellen mit normaler Anzahl an Gen-Kopien zu finden. So kann die Überexpression ebenso durch eine Gen-Mutation hervorgerufen werden.

Kanzerogene Substanzen können durch den Austausch zweier Basen das ErbB2-Genom verändern [5]. Dies bewirkt in einem exprimierten Rezeptor eine kontinuierliche Aktivierung der Tyrosin-Kinase, was in der frühen neuronalen Entwicklung von Nacktmäusen zur Entstehung von Gehirn-Tumoren führte [27].

Für den ErbB4-Rezeptor konnten bisher keine Gen-Mutationen, wie in o. g. Versuchen beim ErbB2-Rezeptors erzeugt, nachgewiesen werden. Untersuchungen des ErbB4-Genes in ErbB4-überexprimierenden Mammakarzinomen auf eine eventuelle Gen-Amplifikation wurden bisher nur durch U. Vogt et al. durchgeführt. Hierzu wurden 176 invasive Mammakarzinome untersucht. Es zeigte sich, dass in 13% der Tumoren eine ErbB4-Gen-Amplifikation gefunden werden konnte [97].

Ein Vergleich mit dem Tumoranteil, welcher bei dieser Arbeit eine ErbB4-Überexpression aufwies, lässt darauf schließen, dass -wie schon beim ErbB2-Rezeptor- die Gen-Amplifikation in mindestens 90% der Fälle die Ursache von ErbB4-Überexpression zu sein scheint. Bei 14% der Mammakarzinome konnte gegenüber dem Normalgewebe ein deutlich niedrigerer ErbB4-mRNA-Gehalt nachgewiesen werden.

Die Existenz von ErbB4-überexprimierenden Tumoren neben solchen, in welchen der ErbB4-Rezeptor deutlich vermindert ist, könnte somit eine Indiz dafür sein, dass unterschiedliche Phasen der Tumorentwicklung ein unterschiedliches ErbB4-Expressionsmuster benötigen. Dies wird in dieser Arbeit durch die Ergebnisse innerhalb der Korrelation des ErbB4-Rezeptors mit dem Malignitätsgrad der Tumoren noch unterstützt. (siehe Kap. 3.3.8.). Tang et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass eine Down-Regulation des ErbB4-Rezeptors vor allem in estrogen-positiven Zellen zu einer Hemmung der Bildung von Tumor-Zellkolonien führte. Eine ErbB4-Überexpression hingegen, die Zellkolonie Bildung bei ER-positiven Zellen stimulierte. [95].

Eine Down-Regulation der ErbB4-Rezeptoren könnte auch auf die Existenz der zwei verschiedenen durch Elenius et al. nachgewiesenen Isoformen zurückzuführen sein, welche sich innerhalb der Tumorentwicklung offensichtlich unterschiedlich verhalten können [30]. Hierfür spricht, dass der ErbB4-überexprimierende Tumor-Anteil und der Tumor-Anteil mit niedrigen ErbB4-Level gegenüber dem Normalgewebe in vergleichbaren Größenordnungen liegen.

Weiterhin konnte noch eine gesonderte Gruppe von Tumoren (19%) separiert werden, in denen der ErbB4-Rezeptor weder im Normalgewebe, noch im Tumorgewebe gefunden werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass der ErbB4-Rezeptor wahrscheinlich nur bei einem Teil der Mammakarzinome durch Interaktion mit dem ErbB2- oder ErbB1-Rezeptor auf die Progression Einfluss nimmt; diese Funktion durch andere ErbB-Rezeptor-Muster jedoch ersetzt werden kann.

Bei einem Großteil der Tumoren (56%) war der ErbB4-mRNA-Gehalt von Tumorgewebe und entsprechenden Normalgewebe vergleichbar. Auch wenn der ErbB4-Rezeptor in diesen Fällen unter Umständen bei der Tumorentwicklung eine Rolle spielte, zeigte sich dies zumindest nicht durch eine veränderte ErbB4-Expression.

Suo et al. wiesen in ihren Studien hingegen nach, dass die ErbB4-Expression in benignen Tumoren höher war als in malignen Tumoren. Hierzu verglichen sie 58 Mammakarzinome mit 10 benignen Mammatumoren. Jedoch sind die beiden untersuchten Gruppen zahlenmäßig sehr unterschiedlich und weiterhin wurden keine Untersuchungen bezüglich des korrespondierenden Normalgewebes durchgeführt, so dass ein Vergleich ganz unterschiedlicher Tumoren sicher schwierig ist. Allerdings könnte die Tatsache, dass hier in den benignen Tumoren eine ausgeprägtere ErbB4-Expression gefunden wurde, darauf hindeuten, dass der ErbB4-Rezeptor eher als positiver und nicht wie bisher angenommen als negativer Prognosefaktor tendenziell zu betrachten ist [93].

Bei der Korrelation der ErbB4-Expression mit der ErbB1-Expression in Mamma-Tumoren zeigte sich im Vier-Felder-Test keine ersichtliche Korrelation auf der mRNA-Ebene. Dies wäre jedoch auf Proteinebene durchaus denkbar und könnte hier zu einer Stabilisierung des ErbB4 auf Proteinebene im Fall einer Amplifikation von ErbB1 führen.

Auffallend war jedoch, dass in der kleinen Gruppe der ErbB4-überexprimierenden Tumoren in 25% der Fälle kein ErbB1-Rezeptor nachweisbar war und in den restlichen 75% der Fälle ein gegenüber dem Normalgewebe verringerter ErbB1-mRNA-Level gefunden werden konnte. Dies könnte auf eine inverse Verbindung zwischen der ErbB4

und ErbB1 hinweisen. Ebenfalls eine inverse Verbindung zwischen dem ErbB1- und dem ErbB4-Rezeptor konnte durch Knowlden et al. 1998 bei der Untersuchung von 47 Steroidrezeptor-positiven primären Mammakarzinomen dokumentiert werden [58]. Dieser könnte mit einer Down-Regulation der ErbB1-Rezeptoren bei einem Überangebot von ErbB4-Rezeptoren zusammenhängen. Karunagaran et al. entdeckten 1995, dass NDF - ein den ErbB4-Rezeptor aktivierender Ligand - die Affinität des für den ErbB1 spezifischen Liganden EGF wie auch – allerdings in geringerem Maße - die Anzahl der exprimierten ErbB1-Rezeptoren verringert. Es zeigte sich, dass NDF die Bildung ErbB1/ErbB4-Heterodimere hemmt und vorhandene Heterodimere derart blockiert, dass EGF schwerer bindet. Notwendige wachstumsstimulierende Signale blieben jedoch offensichtlich über die Aktivierung des ErbB4-Rezeptors selbst und durch die Heterodimerisation mit dem ErbB2-Rezeptor in ausreichenden Maße erhalten, so dass eine Verringerung der ErbB1-Rezeptordichte die Folge war [52].

In dem Anteil der untersuchten Karzinome, bei welchen eine verringerte Expression des ErbB4-Rezeptors nachgewiesen werden konnte, wurde ebenfalls zu 80% eine Verringerung des ErbB1-mRNA-Gehaltes festgestellt. So könnte eine ausreichende ErbB1-Expression an die Bildung von ErbB1/ErbB4-Heterodimeren geknüpft und somit auch bei einer ErbB4-mRNA-Verringerung reduziert sein.

Groenen et al. zeigten 1997, dass - im Gegensatz zu NDF - EGF die Bildung von ErbB1/ErbB4-Heterodimeren fördert und somit über eine ErbB1-ErbB4-Transphosphorylierung zu einer Stimulation der ErbB4-Expression führen kann [37]. Im Gegensatz dazu zeigten Wang et al., dass ErbB1-Homodimer bedeutend schneller endozytiert werden, als entsprechende Heterodimere, so dass auch hier ein ErbB4-Verlust durch den Mangel an ErbB1-Heterodimeren zu einer Verringerung der ErbB1-Dichte führen könnte [100]. Die Tumorgruppen 0 und 2 (Kap.:3.1.2.1.) zeigten keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen der ErbB1- und ErbB4-Expression.

Es scheint also, als ob beide Extreme, die ErbB4-Überexpression wie auch die Low-Level-Expression von ErbB4, mit einer verringerten ErbB1-Expression tendenziell einhergehen. Eine deutliche Veränderung des ErbB4-Levels - in welchem Sinne auch immer - könnte demnach mit einer Verringerung des ErbB1-Levels einhergehen.

Auffallend war jedoch auch, dass generell über 50% der Tumoren einen verringerten ErbB1-mRNA-Level gegenüber dem Normalgewebe aufwiesen, während nur bei einem verhältnismäßig kleinen Teil - weniger als 10% - eine ErbB1-Überexpression

nachzuweisen war. Aufgrund dieser kleiner Gruppe von ErbB1-überexprimierenden Tumoren kann man nur von einer tendenziellen Aussage ausgehen.

In der Literatur wird eine ErbB1-Down-Regulation, wie sie bei 50% der Tumoren gefunden wurde, physiologischerweise bei der laktierenden Mamma beschrieben, während es während der Schwangerschaft zu einer Überexpression an ErbB1 kommt [25]. Die ErbB1-Expression ist also offensichtlich an Hormone und an Wachstumsfaktoren gebunden, welche innerhalb verschiedener physiologischer als auch maligner Entwicklungs-Phasen in unterschiedlicher Konzentration auftreten.

E. Ioachim et al. beschrieben darüber hinaus, dass sie bei ihren Untersuchungen mit Mammakarzinomen eine besonders niedrige ErbB1-Expression bei Malignomen niedrigen Malignitätsgrades fand.

Allerdings war der ErbB1-mRNA-Level innerhalb der Gradeinteilung der hier untersuchten Tumoren etwa gleich verteilt. Es fällt auf, dass 90% der Tumoren Grad 1 bzw. Grad 2 aufwiesen, und nur 6 % Grad 3. Das Stadium G4 war in dieser Tumorgruppe gar nicht zu finden. Die Tatsache, dass 56% der Tumoren eine verringerte ErbB1-Expression aufwiesen, könnte demnach mit dem hohen Anteil an geringen Malignitätsgraden zusammenhängen.

E. Ioachim et al. beschrieben weiterhin - wie auch Yarden et al. und andere - dass der ErbB1-Expressionsgrad eindeutig negativ mit dem ER-Status korrelierte. Dieser Zusammenhang ließ sich jedoch in den hier untersuchten Tumoren nicht nachvollziehen. Die ER-negativen Tumoren waren zu 50% sowohl auf die Tumoren mit verringerten oder nicht nachweisbaren ErbB1-mRNA-Level verteilt als auch auf die restlichen Tumoren

E. Ioachim wies allerdings seine Ergebnisse immunhistochemisch nach, so dass sie mit den hier erhobenen Ergebnissen nur begrenzt vergleichbar sind [50] [109].

Neben dem ErbB1-Rezeptor war es von besonderem Interesse den ErbB2-Rezeptor aufgrund seiner klinischen Relevanz mit dem ErbB4-Rezeptor zu korrelieren. Bekannt ist bisher, dass der ErbB2 zusammen mit dem ErbB4-Rezeptor Heterodimere zu bilden vermag. Obwohl eine direkte Aktivierung des ErbB4-Rezeptors schon zu einer deutlichen Stimulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung führt, bedarf es doch erst des ErbB2-Rezeptors, damit eine spezifische Aktivierung des ErbB4-Rezeptors, beispielsweise mit NDF, zu einer Transformation einer Zelllinie führt [111].

Verschiedene Studien demonstrierten, dass eine Vielzahl von Liganden erst indirekt über den ErbB4-Rezeptor den ErbB2-Rezeptor zu aktivieren vermögen. Für einige - oftmals

auch eng mit der Transformation und somit Tumor-Entwicklung assoziierte Funktionen dieser Liganden - ist die Koexpression des ErbB4 und des ErbB2 also offensichtlich essentiell [78].

Auch im Vergleich des ErbB4- mit dem ErbB2-mRNA-Gehaltes konnte keine Korrelation ermittelt werden, obwohl dies aufgrund der Heterodimerbildung durchaus möglich gewesen wäre. In diesem Fall ist zu bemerken, dass die vorliegenden Ergebnisse sich auf den mRNA-Level beziehen und somit nur bedingt auf die Proteinebene, in welcher ja letztlich die Bildung von Heterodimeren erfolgt, übertragbar sind.

Bemerkenswert war, dass in der hier untersuchten Tumorgruppe nur in 9% der Fälle eine ErbB2-Überexpression nachweisbar war. Dies ist ein geringerer Anteil, als bisher beschrieben. Die Angaben sind auch in der Literatur unterschiedlich, jedoch wird immer von einem Anteil der ErbB2-Überexpression bei Mammakarzinomen von mindesten 20% bis zu 30% ausgegangen [26].

Demnach könnte der Anteil an ErbB2-überexprimierenden Tumoren nicht so stabil sein wie bisher beschrieben. Allerdings ist die Tumoranzahl zu klein, um klare Aussagen darüber treffen zu können.

In der kleinen Tumorgruppe, in welcher der ErbB4-Rezeptor überexprimiert war, wurden unterschiedliche ErbB2-Expressions-Level nachgewiesen. Sie waren in etwa gleich verteilt. Dies stimmt mit den ebenso unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen anderer Arbeiten überein. So beschrieben zwar Beerli et al. und Han et al. gleichermaßen, dass die von ihnen untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien oft gleichzeitig sowohl eine ErbB2- als auch eine ErbB4-Überexpression aufwiesen [9] [44]. Andere Studien wiederum beschreiben jedoch eine ErbB2-Überexpression ohne die Überexpression von ErbB4-Rezeptoren [104].

U. Vogt et al. wiesen 1998 in 19% ihren untersuchten primären Mamma-Karzinomen eine Amplifikation des ErbB2-Gens und in 13% eine Amplifikation des ErbB4-Gens nach. Die jeweilige Gen-Amplifikation führte zu einer Überexpression der entsprechenden ErbB-Rezeptoren. Sie stellt einen der häufigsten Mechanismen für die Überexpression von Onkogenen dar. Interessant in dieser Studie aber war, dass nur in 5 von 176 Tumoren eine Ko-Amplifikation des ErbB2- und des ErbB4-Gens gefunden werden konnte.

Offensichtlich scheinen beide ErbB-Rezeptor-Gen-Amplifikationen sowohl getrennt - jedoch nur in sehr seltenen Fällen gleichzeitig - bei der Tumorentwicklung eine Rolle zu spielen [97].

Dies wird auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. Eine Voraussetzung für die Transformation und somit Tumorentwicklung neben der Amplifikation könnte dennoch die Koexpression (jedoch nicht die Überexpression) des jeweils anderen ErbB-Rezeptors sein. Diese Theorie entwickelten K. Zhang et al. schon in ähnlicher Form aufgrund von Untersuchungen an Zelllinien [111].

Welche Veränderung des ErbB-Expressionsmusters für die Tumorentwicklung günstig ist, könnte demnach von der jeweiligen Tumor-Entwicklungs-Phase abhängig sein.

So konnte der ErbB2-Rezeptor bisher vor allem bei schon fortgeschrittenen metastasierten Brust-Tumoren als eindeutig negativer Prognosefaktor etabliert werden [42] [41]. Dies spricht für eine Veränderung der ErbB-Rezeptor-Expression innerhalb verschiedener Tumor-Entwicklungsphasen.

Bei den Tumoren, in welchen ein verringerter ErbB4-mRNA-Gehalt gegenüber dem Normalgewebe festgestellt werden konnte, zeigte sich, dass bei keinem der Tumoren eine ErbB2-Überexpression nachgewiesen werden konnte. 40% der Tumoren wiesen jedoch eine deutliche Verringerung des ErbB2-mRNA-Gehaltes auf.

Ein solcher tendenzieller Zusammenhang könnte darauf hinweisen, dass eine Verringerung des ErbB4-mRNA-Gehaltes auch zu einer Reduktion der ErbB2-mRNA führt. Dies wäre aufgrund der nicht mehr im selben Maße möglichen Heterodimerisation - da einer der beiden Rezeptoren nicht ausreichend exprimiert wird - denkbar.

D. Karunakaran et al. stellten 1996 in ihren Untersuchungen fest, dass der ErbB2-Rezeptor als ein pan-ErbB-Subunit innerhalb von Heterodimeren mit hoher Affinität gegenüber NDF und EGF aufzufassen wäre [53]. Da NDF ein ErbB4-spezifischer Ligand ist, wäre eine Down-Regulation des ErbB2-Rezeptors in diesem Zusammenhang denkbar, da die Möglichkeit einer Transphosphorylisierung über den ErbB4-Rezeptor sich verringern würde.

In den anderen beiden Tumorgruppen, in welchen - verglichen mit dem Normalgewebe - keine Veränderungen des ErbB4-mRNA-Gehaltes oder ein Fehlen der ErbB4-Expression nachgewiesen werden konnten, waren die verschiedenen ErbB2-Expressions-Level ebenfalls gleich verteilt.

Man muss bezüglich beider oben erwähnter Korrelationen sagen, dass bei den vorliegenden kleinen Tumorgruppen auch in diesem Fall nur tendenzielle Aussagen gemacht werden können, die noch weiterer Studien mit größerer Tumoranzahl bedürfen.

Ein nächster Schritt war es nun, die ermittelten Werte der ErbB4-mRNA-Level mit den zur Verfügung stehenden klinischen Daten der Mammakarzinome zu vergleichen und eventuelle Zusammenhänge herauszuarbeiten.

Zunächst wurde die Tumorgöße eines jeden Mammakarzinoms mit dem korrespondierenden ErbB4-mRNA-Level verglichen. Tendenziell schien hier zunächst eine fortgeschrittene Tumorgöße mit einer erniedrigten ErbB4-Expression einherzugehen.

Im Gegensatz dazu weisen Tumoren kleinerer Größe einen erhöhten bzw. vergleichbaren ErbB4-mRNA-Level auf. U. Vogt et al. demonstrierten im Gegensatz dazu jedoch an 146 untersuchten Mammakarzinomen eine direkte Korrelation der Tumorgöße mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt [97]. Dies wäre aus den hier erhobenen Daten nicht ersichtlich.

Um genauere Aussagen bezüglich dieses Zusammenhanges machen zu können, wären Untersuchungen an einem Tumorgut notwendig, welches einen größeren Anteil an Tumoren über 5 cm Größe besitzt. In dem hier verwendeten Tumorgut wiesen nur 4% eine Größe über 5 cm auf, was für eine frühzeitige Diagnose der hier verwendeten Tumoren spricht.

Der Vergleich der ErbB4-Expression eines jeden Tumors mit seiner Ausdehnung T ergab ebenfalls keine deutliche Korrelation. Jedoch war hier wieder auffällig, dass in allen 3 Tumoren, welche sich im Stadium T4 befanden, keine ErbB4-mRNA nachweisbar war.

Auch ein Vergleich des Nodalstatus der an dem Tumor erkrankten Patientinnen mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt der Tumoren ergab keine Korrelation. Dies ist angesichts der deutlichen klinischen Aussagekraft, welche die Anzahl und die Herkunft der betroffenen Lymphknoten als etablierte Prognosefaktoren haben, nicht verwunderlich, da ein derartig klarer prognostischer Zusammenhang mit dem ErbB4-Rezeptor weder bisher beschrieben noch vermutet werden konnte. Tendenziell war allerdings auch hier wieder auffallend, dass 67% der Tumoren, bei welchen eine ErbB4-Überexpression festgestellt wurde, Lymphknoten-negativ waren. Der einzige Tumor, welcher im Stadium N2 gefunden werden konnte, wies gar keine ErbB4-mRNA auf. Diese Tendenz könnte die Theorie von einer inversen Beziehung des ErbB4-Rezeptors zu negativen Prognosefaktoren unterstützen. Das bekräftigen auch die Ergebnisse bezüglich des Malignitätsgrades der Tumoren. Dieser inzwischen etablierte histologische Prognosefaktor, der Malignitätsgrad, zeigte zwar keine eindeutige Korrelation, jedoch einen interessanten klaren tendenziellen Zusammenhang. Bei drei der vier Tumoren, bei welchen histologisch der Malignitätsgrad 1 festgestellt wurde, konnte eine ErbB4-Überexpression nachgewiesen werden. Beim vierten

Tumor war der ErbB4-mRNA-Level vergleichbar. Im Gegensatz dazu war in den einzigen 2 Tumoren mit Grad 3 gar keine ErbB4-Expression nachweisbar.

Die ErbB4-Expression könnte demnach mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzelle abnehmen. Dies wäre insofern nachvollziehbar, als eine in zunehmenden Maße entdifferenzierte Zelle zu einer transkriptiven Leistung - wie der ErbB4-Expression - nicht mehr so gut fähig wäre. Allerdings zeigte sich bei den zwei Tumoren im Malignitätsgrad 2, dass auch die korrespondierenden Normalgewebe keine ErbB4-Expression aufwiesen. Dies spricht wiederum gegen die These, dass die ErbB4-Expression aufgrund der Entdifferenzierung abnimmt bzw. erlischt. Nichts desto trotz scheint es eine inverse Verbindung zwischen dem Malignitätsgrad der Tumoren und der ErbB4-Expression zu geben.

D. Marx et al. beschrieben 1990 eine signifikant positive Korrelation zwischen der ErbB2-Expression und dem Malignitätsgrad. F. Revillion konnte dies jedoch in vergleichbaren Untersuchungen nicht als klare Korrelation bestätigen [69] [81].

Demnach sind die Ergebnisse selbst bezüglich des ErbB2 uneinheitlich, auch wenn hier eher eine positive Korrelation beschrieben wird.

Dies könnte bedeuten, dass der Beginn der Tumorentwicklung - bzw. die Transformation der Zellen - den ErbB4-Rezeptor als Ko-Faktor benötigt und eine ErbB4-Überexpression dies initial u. U. sogar begünstigt. Im weiteren Verlauf der Tumorprogression dann jedoch die ErbB2-Expression in den Vordergrund tritt und die ErbB4-Expression sogar abnimmt.

Diese Annahme würde durch die besondere Bedeutung des ErbB2-Rezeptors vor allem bei Mammakarzinomen fortgeschrittenen Stadiums, wie sie immer wieder beschrieben wird, unterstützt. Auch bei diesem Vergleich fiel auf, dass 82%, also über $\frac{3}{4}$ der Tumoren den Malignitätsgrad 2 aufwiesen. Diese Tumoren verteilten sich, wenn man die Größe der einzelnen ErbB4-Expressions-Tumorgruppen in Rechnung stellt, etwa gleichmäßig, auf die 4 Gruppen. Es kann also auch hier - wenn überhaupt - nur eine tendenzielle Aussage gemacht werden.

Ein weiterer für die Prognose und vor allem für die Therapieentscheidung wichtiger Faktor ist das Alter der Patientinnen. Jedoch ergab sich - wie zu erwarten - keine direkte Korrelation zwischen dem ErbB4-mRNA-Gehalt und dem Alter zum Zeitpunkt der Operation. Ein solcher Zusammenhang wurde bisher auch kaum für andere Onkogene beschrieben. A.Borg et al. wiesen allerdings in ihren Untersuchungen eine direkte Korrelation von ErbB2-Gen-Amplifikationen und dem Alter der Patienten unter 40 Jahren

nach. Ein Auftreten des Mammakarzinoms unter 40 Jahren gilt als anerkannter negativer Prognosefaktor, wie auch eine ErbB2-Überexpression als negativer Prognosefaktor beschrieben wurde [10].

Von besonderem Interesse war es, den ER- (Estrogen-Rezeptor) wie auch den PgR-Status (Progesteron-Rezeptor) mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt zu korrelieren, da verschiedene Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen den ErbB-Rezeptoren und den hormonell gesteuerten Rezeptoren hingewiesen haben. Der ER als auch der PgR gelten im Gegensatz zum ErbB1 und ErbB2-Rezeptor als deutlich positive Prognosefaktoren bei Mammakarzinomen.

Obwohl zahlreiche, zum Teil sehr umfangreiche Veröffentlichungen die positive Korrelation des ER-Levels und einer Ansprechbarkeit des jeweiligen Tumors auf eine antihormonelle Therapie bekräftigen, ist diese Korrelation nicht absolut.

Während zum Beispiel mehr als 60 % aller Mammatumoren ER positiv sind, sprechen nur 2/3 dieser Tumoren auf eine antihormonelle Therapie an [74] [77]. Entsprechend sind 30-40% der Mammakarzinome gegen eine antihormonelle Therapie resistent. Hinzu kommt, dass 5 bis 10 % der Patienten mit einem ER negativen Status auf eine endokrine Therapie ansprechen. Demnach könnten andere Faktoren - wie beispielsweise die ErbB-Rezeptoren - auf das Gelingen einer hormonellen Therapie Einfluss haben. So konnte durch R. Yarden et al. und Chrysogelos et al. eine deutlich inverse Korrelation zwischen dem ErbB1 und dem Estrogen-Rezeptor nachgewiesen werden [18] [109].

Besonders interessant war die Entdeckung, dass die ErbB1-Expression einen Hinweis auf den eventuellen Nutzen einer Tamoxifen - Therapie geben kann. So zeigte sich, dass ein erhöhter ErbB1-Level gegen den Einsatz einer Tamoxifen – Therapie spricht, da selbst Steroid-Rezeptor-positive Tumoren mit einer ErbB1-Überexpression in der Regel sehr schlecht auf dieses Antiestrogen ansprechen [45].

Borg et al. berichteten ebenfalls über eine inverse Korrelation zwischen einer ErbB2-Gen-Amplifikation und dem Estrogenrezeptor. Demnach wiesen alle Mammakarzinome mit einer ErbB2-Gen-Amplifikation ein Fehlen von Estrogenrezeptoren auf [10] [108].

Der Progesteronrezeptor ist der zweite Steroidrezeptor, der neben dem Estrogenrezeptor als positiver prognostischer Faktor inzwischen eine wichtige Stellung einnimmt. Auch für ihn konnte eine inverse Korrelation zum ErbB1 und ErbB2 nachgewiesen werden [51] [92].

Aufgrund der vielfältigen Interaktionen zwischen den verschiedenen ErbB-Rezeptoren gab es Grund zur Annahme für eine Veränderung des ErbB4-mRNA-Gehaltes in Abhängigkeit

zum ER- oder PR-Status. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem ErbB4-mRNA-Gehalt und dem ER-, oder dem PR-Status nachgewiesen werden. Dies mag zum einen daran liegen, dass der ER-Nachweis immunhistochemisch erfolgte, während der ErbB4-mRNA-Gehalt mittels RT-PCR ermittelt wurde. Diese Ergebnisse sind nur bedingt miteinander vergleichbar. Zum anderen wurde nur die mRNA-Ebene betrachtet. Auf Proteinebene sind trotz dieser Ergebnisse Verbindungen denkbar. Tang et. al. konnten beispielsweise 1999 zeigen, dass eine Down-Regulation des ErbB4-Rezeptors in T-47-D und MCF-7, d.h. in Mammakarzinomzelllinien, die hohe Level an ErbB4 exprimieren und zugleich ER positiv sind - den Verlust des in Kolonieförmigen geordneten Wachstums zur Folge hatten.

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-453 hingegen, welche ER-negativ ist, zeigte keine derartigen Veränderungen bei entsprechend niedrigen ErbB4-Expressions-Levels. Dies könnte für einen Einfluss des ErbB4 auf das Wachstumsverhalten der Zellen in Abhängigkeit vom ER sprechen. Jedoch scheint dieser Zusammenhang eher im Wachstumsverhalten als auf mRNA-Niveau deutlich zu werden [95]. Es fällt allerdings auf, dass die Verteilung der ErbB4-Expression bezüglich beider Steroidrezeptoren vergleichbar war.

Neben dem ErbB2-Rezeptor rückte das Tumor-Suppressor-Gen p53 in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Das von B. Vogelstein et al. entdeckte Gen reguliert offensichtlich die DNS - Reparatur-Vorgänge und vermag die Zelle für diese Reparaturzeit zwischen den beiden Zellzyklusphasen G1 und S zu arretieren. Es schützt demnach die Zelle vor einer Transformation und sichert somit die Tumor-Suppressor-Funktion.

Die maligne Progression des Mammakarzinoms bis zum vollständig metastasierten Stadium kann demnach auch durch die Mutation, die Inaktivierung, den Verlust oder die Down-Regulation der Expression von Tumor-Suppressor-Genen - wie dem p53 - bedingt sein. Das p53-Gen ist in etwa 20% bis 50% der Fälle bei Mammakarzinomen mutiert [2] [33]. Eine Mutation, die meist an besonders sensiblen Regionen des Genes stattfindet, führt zur Instabilität des Proteinprodukts, so dass sich dieses Gen nunmehr nicht mehr vor einer Entartung der Zelle zu schützen vermag. Der Verlust des funktionstüchtigen p53-Gens führt wahrscheinlich zu einer DNA-Instabilität und so zur Krebs-Entwicklung [22].

Aktuelle Studien beschäftigten sich nun mit der Frage, ob die beiden neueren - unabhängig von einander gefundenen Prognosefaktoren ErbB2 und p53 - miteinander in Verbindung

stehen. So berichteten R. Naidu et al. bei Untersuchungen von 134 primären Mammakarzinomen über eine signifikante Korrelation zwischen dem ErbB2 und p53 [72]. Eine andere Gruppe fand bei Experimenten mit transgenen Mäusen heraus, dass die ErbB2-vermittelte Onkogenese mit dem mutierten p53-Gen eine Beziehung aufweist. Auch hier konnte in den Tumoren, welche eine Amplifikation des ErbB2-Gens aufwiesen, ein gehäuftes Auftreten von p53-Genmutationen nachgewiesen werden [65]. T. Castiglioni et al. konnten hingegen bei ihrer Untersuchung von insgesamt 85 Tumoren keine derartige Korrelation finden [17].

Eine weitere Arbeit an Mammakarzinom-Zelllinien konnte interessanterweise eine Heregulin induzierte Stabilisierung des p53-Gens und eine damit verbundene Steigerung der p53-Expression nachweisen [3]. Da Heregulin ein nachgewiesener Ligand des ErbB4-Rezeptors darstellt, war die Frage nach einer Verbindung zwischen der ErbB4-Expression und p53 naheliegend. Ein derartiger Zusammenhang wurde bisher in der Literatur auch noch nicht erwähnt. Der p53-positive Tumor-Anteil lag mit 32% im Normalbereich und war mit dem von T. Castiglioni nachgewiesenen Anteil von 29% vergleichbar [17].

Eine Korrelation dieser beiden Expressionslevel konnte nicht nachgewiesen werden. Tendenziell auffallend war jedoch, dass die beiden Tumorgruppen, bei denen sich der ErbB4-mRNA-Gehalt gegenüber dem Normalgewebe deutlich verändert hatte, ausschließlich p53 negativ waren. Demnach wiesen sowohl die Tumoren mit einer ErbB4-Überexpression als auch mit einer Verringerung des ErbB4-mRNA-Gehaltes keine p53-Mutation auf. Da beide Tumorgruppen jedoch sehr klein waren, ist dieser Zusammenhang nicht klar herstellbar.

Eine mögliche Erklärung für einen derartigen Zusammenhang ist unklar. Es könnte jedoch bedeuten, dass nur solche Zellen, welche p53-negativ sind, zu einer Veränderung der ErbB4-Expression in der Lage wären.

Allerdings wurden auch hier wieder die aus Bad Berka stammenden Daten immunhistochemisch erhobenen und mit den RT-PCR-Ergebnissen korreliert. Dies schränkt die Aussagekraft einer solch tendenziellen Aussage weiter ein. Zusammenfassend kann wohl gesagt werden, dass keine Verbindung auf molekularbiologischer Ebene zwischen dem Tumor-Suppressor-Gen p53 und dem ErbB4-Rezeptor gefunden werden konnte, obwohl derartige Beziehungen zwischen dem ErbB2-Rezeptor und p53 wahrscheinlich bestehen.

Während die Durchflußzytometrie und auch der Thymidin-Labeling-Index methodisch relativ aufwendig sind, ist der immunhistochemische Nachweis von proliferationsassoziierten Antigenen heute fast überall bei Mammakarzinomen möglich und insofern weit verbreitet. Das bekannteste von Gerdes 1983 entdeckte Antigen heißt Ki-67 und lässt sich durch den Antikörper Mib-1 nachweisen. Die prognostische Wertigkeit ist durchaus mit anderen etablierten Proliferationsmarkern -beispielsweise der S-Phasenfraktion- vergleichbar [11] [14].

Der Nachweis des Proliferationsmarkers MIB-1 spricht als negativer Prognosefaktor für eine hohe Proliferationsrate des Tumors und somit für ein schnelles Tumorwachstum.

Er korreliert mit den meisten fest etablierten klinischen Prognosefaktoren für Brustkrebs, wie Malignitätsgrad, Tumorgröße, DNA-Aneuploidie oder dem Fehlen von Steroidhormon-Rezeptoren.

Eine kürzlich durchgeführte Studie konnte darüber hinaus eine deutliche Korrelation zwischen MIB-1 und dem ErbB2-Rezeptor bei 356 Lymphknoten-negativen Mammakarzinomen finden [83]. Zuvor hatten schon E. Ioachim et al. über eine Beziehung zwischen dem ErbB1, dem ErbB2 und MIB-1 berichtet [50]. Demnach war auch in diesem Fall eine Betrachtung des ErbB4-mRNA-Gehaltes in Verbindung mit dem MIB-1 von Interesse.

Eine Korrelation der ErbB4-Expression mit dem Proliferationsmarker MIB-1 ließ sich jedoch nicht nachweisen, obwohl offensichtlich eine Verbindung von MIB-1 zu den eng mit dem ErbB4-Rezeptor kommunizierenden ErbB1- und ErbB2-Rezeptoren besteht.

Ein Großteil der Tumoren (68%) zeigte eine deutliche Anreicherung von MIB-1. Auffallend war die Tatsache, dass alle 7 Tumoren, in welchen - wie auch im korrespondierenden Normalgewebe - keine ErbB4-mRNA gefunden werden konnten, eine deutliche Anreicherung des MIB-1-Antikörpers aufwiesen.

Dies könnte - wie schon beim Vergleich des ErbB4-mRNA-Gehaltes mit dem Malignitätsgrad vermutet - auf eine inverse Relation des ErbB4 zu MIB-1 und in diesem Zusammenhang auch generell auf den ErbB4 als positiven Prognosefaktor hindeuten. Da allerdings nur 15% eine geringe Anreicherung von MIB-1 aufwiesen, kann dies wiederum nur eine tendenzielle Aussage sein.

Der durchflusszytometrisch zu ermittelnde Ploidie-Status eines Tumors ist gegenüber MIB-1 weniger als Proliferationsmarker aufzufassen, sondern liefert vielmehr eine Aussage über

den Grad der Entdifferenzierung der Tumorzelle. Er trat jedoch in letzter Zeit vor allem gegenüber den neueren Proliferationsmarkern in seiner Wertigkeit zurück.

Aneuploide Tumorzellen sprechen in verschiedenen Studien für eine ungünstige Prognose von Mammakarzinomen, tetraploide Tumorzellen hingegen für eine bessere und diploide für eine wesentlich bessere Prognose [96]. Andere Untersuchungen konnten jedoch keinen derartigen signifikanten Zusammenhang nachweisen [73] [103].

P. Rudolph et al. untersuchten 1999 356 nodal-negative Mammakarzinome. Sie fanden hierbei unter anderem eine Korrelation zwischen der ErbB2-Expression und DNA-Aneuploidie, so dass auch hier - aufgrund der nachgewiesenen Interaktionen zwischen dem ErbB2- und dem ErbB4-Rezeptor - eine Untersuchung des Ploidie-Status im Zusammenhang mit dem ErbB4-mRNA-Gehalt durchgeführt wurde [83].

Ein klarer Zusammenhang konnte -wie auch bezüglich des DNA-Malignitätsgrades- nicht nachgewiesen werden. Die beiden Parameter korrelierten nicht mit dem ErbB4.

Die erhobenen Daten unterstützen die eher uneinheitlichen Ergebnisse anderer Untersuchungen und damit die Zweifel an einer prognostischen Aussagekraft des Ploidie-Status.

Um die Beeinflussbarkeit des ErbB4-mRNA von anderen Faktoren - wie wachstumsstimulierenden oder -hemmenden Substanzen - betrachten zu können, wurde die ErbB4-Expression in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien untersucht.

Die Wahl fiel auf die 3 Zelllinien T-47-D, BT-474 und MDA-MB-435S, da sie sich bezüglich bestimmter Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden. Diese unterschiedlichen Eigenschaften waren hinsichtlich der Bestimmung des ErbB4-Gehaltes von besonderem Interesse. So konnten in der Zelllinie T-47-D Steroidrezeptoren, insbesondere Estrogen- und Progesteronrezeptoren, nachgewiesen werden. Somit wird diese Zelllinie auch sensibel gegenüber einer antihormonellen Therapie beschrieben [23] [16]. Die anderen zwei Zelllinien hingegen sind ER-negativ und gegenüber einer antihormonellen Therapie nicht sensibel.

Die Zelllinie BT-474 ist auch noch in einem anderen Zusammenhang interessant. In zahlreichen Arbeiten wurde für BT-474 eine ErbB2-Überexpression beschrieben [87]. Für MDA-MB-435S wurde weder eine ErbB1 noch eine ErbB2-Überexpression beschrieben. Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften der Zelllinien, welche sowohl therapeutische als auch prognostische Relevanz haben, war die Frage nach etwaigen Unterschieden in ihrer ErbB4-Expression von Interesse.

Bei der Untersuchung des ErbB4-mRNA-Gehalts zeigte sich, dass die ErbB4-Expression in allen drei Zelllinien unterschiedlich war. Der ErbB4-mRNA-Gehalt war bei T-47-D am höchsten. Er war 20-fach höher als bei BT-474. Überraschenderweise konnte bei MDA-MB-435S gar keine ErbB4-mRNA nachgewiesen werden. Diese Daten korrespondieren mit den Untersuchungsergebnissen von C. Sawyer et al., welche beim Vergleich verschiedener Karzinom-Zelllinien den höchsten ErbB4-mRNA-Gehalt ebenfalls in T-47-D nachwiesen.

Diese Ergebnisse wurden hierbei durch Southern-Blot-Analysen bestätigt [86].

Es fällt auf, dass die ErbB4-Expression in der Steroidrezeptor-positiven Zelllinie am höchsten war. Auch hier zeigte sich wieder eine tendenzielle Korrelation hin zu positiven Prognosefaktoren, wie dem positiven ER-Status, als zu negativen, wie dem ErbB2-Rezeptor.

In diesem Zusammenhang wiesen auch die Untersuchungsergebnisse von R. Kumar et al. eine Verbindung zwischen dem ErbB4-Rezeptor und dem ER-Status auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NDF-vermittelte Expression eines bestimmten Proteins (p45) nur bei der Exposition von ER-positiven Zellen, wie T-47-D, mit NDF angeregt wird, nicht bei ER-negativen Zellen [61]. Da NDF als spezifischer Ligand von ErbB4 beschrieben wird, wäre demnach eine Verbindung zwischen dem ER-gesteuerten und dem ErbB4-gesteuerten Pathways denkbar [80].

Eine andere Arbeit durch C. Tang et al. wies ebenfalls darauf hin, dass die ErbB4-Expression in ER-positiven-Mammakarzinomen bzw. Zelllinien wie T-47-D eine Rolle bei deren Proliferation spielen könne [95].

In weiteren Untersuchungen wurden der ErbB1- und der ErbB2-mRNA-Gehalt in den drei Mammakarzinom-Zelllinien bestimmt. Hierbei zeigte sich zwischen T-47-D und BT-474 eine zum ErbB4-mRNA-Gehalt entgegengesetzte Tendenz bezüglich des ErbB2-mRNA-Gehalts.

Die ErbB2-Expression erwies sich bei BT-474 am höchsten. Sie ist zehnfach höher als bei T-47-D. Dies unterstützt andere Arbeiten, die ebenfalls einen besonders hohen ErbB2-mRNA-Gehalt bei BT-474 nachwiesen [13] [38]. In BT-474 tritt der höhere ErbB2-mRNA-Gehalt, welcher für eine schlechtere Prognose bei metastasierten Mammakarzinomen spricht, zusammen mit dem ebenfalls als negativen Prognosefaktor betrachteten negativen ER-Status auf.

Der ErbB4-mRNA-Gehalt hingegen ist in dieser Zelllinie bedeutend geringer als bei T-47-D. Trotz eines Modells, in dem beide Rezeptoren -ErbB4 und ErbB2- eng miteinander agieren, zeigt sich hier eine gegenläufige Tendenz [62].

M. Grotecleas et al. führen die ErbB2-Überexpression in der Mammakarzinom-Zelllinie BT-474 auf besonders Cis-reiche Promotorregion zurück, welche in dieser Zelllinie transkriptionell besonders aktiv ist. Eine derartige Aktivität konnte im Gegensatz dazu bei T-47-D nicht gefunden werden [38]. Diese Cis-reiche Sequenz konnte später durch dieselbe Arbeitsgruppe mittels des HER2-Transkriptions-Faktors (HTF) in BT-474 bestätigt werden [39].

Eine Expression von ErbB2 könnte zum anderen durch das Fehlen von Steroid-Rezeptoren begünstigt sein. So konnte nachgewiesen werden, dass Estrogen die ErbB2-Expression reduziert. Dieser Effekt ist jedoch in Zellen, die eine ErbB2-Überexpression aufweisen, nicht mehr nachweisbar [101].

Ebenso ist das Wachstum ER-negativer Zellen nicht mehr mit Estrogen stimulierbar. Diese Effekte sind weniger auf den Verlust oder Defekt der ER's oder PgR's zurückzuführen, als wahrscheinlich vielmehr darauf, dass die Tumorzelle aufgrund eines Hormonmangels ihre basale Wachstumsstimulation auf eine hormonunabhängige umstellt [23].

Für den in einigen Arbeiten als negativer Prognosefaktor für nicht metastasierende Mammakarzinome beschriebenen ErbB1 konnte die höchste Expression in BT-474 gefunden werden [84]. Der ErbB1-mRNA-Gehalt von T-47-D betrug hingegen ein Zehntel des ErbB1-mRNA-Gehaltes von BT-474. Auch hier scheinen die Steroid-Rezeptoren wieder eine Rolle zu spielen. So zeigte sich, dass TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) - eine Substanz, welche in ER-positiven Zelllinien wie T-47-D die ErbB1-Phosphorylierung verringerte - dies in der ER-negativen Zelllinie BT-474 nicht vermochte [59].

Zajchowski et al. stellten heraus, dass der ErbB1-Level in ER-positiven Zelllinien gegenüber ER-negativen. Zelllinien deutlich verringert war [110]. Eine andere Arbeitsgruppe schlussfolgerte aufgrund ihrer Ergebnisse, dass das Mammakarzinom sich vom ER-positiv-Tumor mit niedrigen ErbB1-Level zum aggressiven, hormon-unabhängigen ER-negativ-Tumor mit hohen ErbB1-Level entwickeln kann [18]. Dem ErbB1 könnte demnach also eine Bedeutung bei der Entwicklung des hormonsensiblen Mammakarzinoms zu einem hormonunsensiblen Tumor zu kommen

Im Fall der Zelllinie MDA-MB-435S zeigte sich allerdings, dass sie neben einem nicht nachweisbaren ErbB4-mRNA-Gehalt auch den niedrigsten ErbB1- und ErbB2-mRNA-

Gehalt aufwies. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Zelllinie aufgrund ihrer starken Entdifferenzierung nicht mehr in der Lage war, diese speziellen Wachstumsrezeptoren zu exprimieren.

Der erste Inkubationsversuch - im Anschluss an die Bestimmung der ErbB-mRNA verschiedener Zelllinien - wurde mit drei verschiedenen EGF-Konzentrationen an T-47-D durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der ErbB4-mRNA-Gehalt im Vergleich zur Kontrollkultur verringert war. Bei der Untersuchung des ErbB1- und ErbB2-mRNA-Gehaltes zeigten sich hingegen kaum Änderungen. Dies könnte mit dem beispielsweise gegenüber BT-474 verringerten ErbB1 und ErbB2-Level zusammen hängen. T-47-D besitzt als Steroid-Rezeptor positive Zelllinie eine verhältnismäßig geringe ErbB1- und ErbB2-Expression, was auch durch die vorangegangenen Daten schon dokumentiert wurde und ebenso durch die Ergebnisse von Yarden et al. bestätigt wird [109].

Die ErbB-4 Expression hingegen in T-47-D ist gerade gegenüber BT-474 verhältnismäßig hoch. Bisher war EGF jedoch nur als spezifischer Ligand für den ErbB1 bekannt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von L. Wang et al. hingegen zeigte, dass EGF auch in der Lage ist, die ErbB4-Tyrosin-Kinase in Zellen zu aktivieren, die ausschließlich ErbB4- und keine ErbB1 oder ErbB2-Expression aufweisen [99]. Dies wäre ein erstes Indiz dafür, dass EGF nicht nur indirekt über ein ErbB1-Heterodimer, sondern auch auf direktem Weg den ErbB4 zu binden und zu aktivieren vermag.

So wäre denkbar, dass eine ausreichende ErbB4-Rezeptor-Aktivierung, wie sie unter Umständen auch durch EGF indirekt als auch direkt erfolgen könnte, eine konsekutive Down-Regulation der ErbB4-Expression zur Folge hätte. Dies könnte in der untersuchten Zelllinie der Fall sein.

Zu einer deutlichen Down-Regulation der an sich schon geringen ErbB1- und ErbB2-Expression bei T-47-D kam es hingegen aufgrund der geringen basalen Expression nicht. Unterschiedliche Konzentrationen von EGF zeigten entsprechend dosisabhängige Veränderungen des ErbB4-mRNA-Levels. Die Tatsache, dass die Wirkung von EGF stark von der Dosis abhängig ist, konnte schon durch zahlreiche Studien belegt werden und zeigte sich auch wieder in diesem Experiment [26].

Die deutlichste Reduktion von ErbB4 war bei 50 ng EGF sichtbar, weshalb diese Konzentration auch in die weiteren Experimente übernommen wurde. Allerdings konnte in den sich anschließenden Inkubationsversuchen nur bei BT-474, aber nicht bei T-47-D, eine leichte Reduktion der ErbB4-Expression unter einer 96-stündigen Inkubation mit EGF

beobachtet werden. Eine deutliche Wirkung auf die ErbB4-Expression von T-47-D bleibt deshalb trotz dieser Ergebnisse zweifelhaft.

Aufgrund der vielfältigen Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien T-47-D und BT-474 war es von Interesse, die Wirkung einer durch EGF und TGF α veränderten ErbB-Rezeptor-Aktivität auf die ErbB-Expression beider Zelllinien im Vergleich zu untersuchen. Hierbei konnte die im vorangegangenen Inkubationsversuch beobachtete Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes bei T-47-D durch die Einwirkung von EGF nicht bestätigt werden. Vielmehr war innerhalb einer 96-stündigen Inkubation von T-47-D mit 50 ng EGF keine deutliche Veränderung des ErbB4-mRNA-Gehaltes zu beobachten.

Demnach scheint nach einer anfänglichen Reduktion der ErbB4-Expression unter einer 24-stündigen Einwirkung von EGF ein Rebound-Effekt zum Tragen zu kommen, unter dem der ErbB4 wieder ansteigt.

Im Gegensatz zu T-47-D konnte für BT-474 eine tendenzielle Reduktion des ErbB4-mRNA-Levels unter der 96-stündigen Inkubation mit EGF nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt vielleicht in der bedeutend höheren ErbB1 und ErbB2-Expression gegenüber T-47-D. So wäre es denkbar, dass die direkte Aktivierung und Stabilisierung der ErbB1/ErbB4-Heterodimere zu einer Down-Regulation der ErbB4-Expression führen könnte.

Dies ist um so mehr der Fall, als EGF den ErbB1 nicht nur aktiviert, sondern die Bildung von ErbB1-Heterodimeren - so auch mit ErbB4-Rezeptoren - fördert. Dieser Effekt wird umso wahrscheinlicher, je mehr EGF-Rezeptoren zur Liganden-Bindung vorhanden sind. Diese Voraussetzung war bei BT-474 in besonderem Maße erfüllt.

Andererseits stabilisiert EGF die Heterodimere, so dass diese - wie durch Wang et al. 1999 demonstriert - bedeutend weniger rasch der Endozytose unterliegen als ErbB1-Heterodimere. Auch dies könnte einen downregulierenden Effekt auf die ErbB4-Expression ausüben [100]. Demzufolge wäre auch eine Senkung des ErbB1-mRNA-Levels bei BT-474 zu erwarten gewesen.

Im Verlauf der 96-stündigen Inkubation mit EGF zeigte sich weder bei BT-474 noch bei T-47-D eine Veränderung des ErbB1-mRNA-Gehaltes.

Auch der ErbB2-mRNA-Gehalt wurde in beiden Zelllinien nicht wesentlich durch die Inkubation mit EGF beeinflusst. Es zeigte sich aber bei BT-474 eine tendenzielle Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes unter der Wirkung von EGF. Für diese Zelllinie wurde in den hier durchgeführten Experimenten wie auch in andern Untersuchungen eine

besonders hohe ErbB2-Expression - welche ihren Grund in einer ErbB2-Gen-Amplifikation hat - beschrieben [94] [87]. Insofern wäre denkbar, dass auch die durch Gronen et al. beschriebenen ErbB1:ErbB2-Heterodimere durch EGF stabilisiert werden, was eine Down-Regulation des ErbB2-mRNA-Gehaltes zur Folge haben könnte [37].

Die bedeutend geringere ErbB2-Expression könnte der Grund dafür sein, dass bei T-47-D keine derartige Tendenz sichtbar wurde. Allerdings lassen die Ergebnisse keine klare Aussage zu, da die Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu schwach waren.

Die Inkubation mit TGF α offenbarte hingegen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien bezüglich der ErbB4-Expression. Hierbei zeigte sich erstaunlicherweise, dass die Bindung von TGF α an die entsprechenden Erfolgsrezeptoren eine deutliche Steigerung der ErbB4-Expression bei T-47-D und eher eine Reduktion des ErbB4-mRNA-Gehaltes bei BT-474 zur Folge hatte.

Zajchowski et al. stellten in diesem Zusammenhang fest, dass Steroid-Rezeptor-positive Mammakarzinom-Zelllinien wie T-47-D eine nur sehr geringe autokrine TGF α -Produktion besitzen [110]. So wäre es denkbar, dass aufgrund einer geringeren TGF α -Basis-Konzentration, solche Zelllinien vulnerabler gegenüber TGF α sind.

Ältere Untersuchungen konnten eine Liganden-Funktion von TGF α bisher nur für den EGF-Rezeptor nachweisen [60]. L. Wang et al. konnten jedoch an genetisch veränderten Zelllinien, welche ausschließlich den ErbB4-Rezeptor exprimierten, durch EGF als auch TGF α eine Tyrosin-Kinasen-Aktivierung demonstrieren. Somit vermögen wahrscheinlich beide Liganden nicht nur indirekt über ErbB1/ErbB4-Heterodimere, sondern durch eine direkte Liganden-Rezeptor-Interaktion den ErbB4-Rezeptor zu aktivieren [99].

Die Wirkungen von EGF und TGF α sind hierbei zwar ähnlich, aber nicht gleich. Aufgrund der geringen autokrinen TGF α -Produktion innerhalb der Zell-Kultur von T-47-D scheint TGF α im Gegensatz zu EGF eine deutliche Hochregulierung der ErbB4-Expression zu bewirken. Diese Steigerung des ErbB4-mRNA-Gehaltes erreichte nach 72 h mit einer Steigerung auf den 2,6-fachen Wert der Kontroll-Kultur ihren Höhepunkt und war nach 96 h kaum noch nachweisbar. Es wäre denkbar, dass die Zelle die Bindungsmöglichkeiten für das angebotene TGF α innerhalb der ersten 72 h durch eine Steigerung der ErbB4-Expression zu erhöhen versucht. Der ErbB4-Rezeptor könnte demnach - aufgrund seiner gegenüber BT-474 deutlich erhöhten Expression in T-47-D - eine wichtige Rolle bei der Aktivierung durch TGF α , z.B. innerhalb von ErbB1/ErbB4-Heterodimeren, spielen.

Daly et al. beschrieben, dass die Entwicklung der hormonsensiblen Zelllinie T-47-D zu einer transformierten hormonunsensiblen aggressiveren Zelllinie mit einer Erhöhung des

TGF α Spiegels einherging [24]. Dies scheint den transformierenden Effekt von TGF α zu bestätigen. Es wäre denkbar, dass ein Regelmechanismus der noch nicht transformierten T-47-D-Zelle zur Senkung eines gestiegenen TGF α -Levels den ErbB4-Rezeptor einbezieht. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für den gestiegenen ErbB4-mRNA-Gehalt darstellen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei BT-474 unter der TGF α - wie auch schon unter der EGF-Inkubation beobachtet, hier aber wesentlich deutlicher - eine ErbB4-mRNA-Reduktion. BT-474 besitzt jedoch im Vergleich zu T-47-D als Steroid-Rezeptor negative Zelllinie ungleich mehr ErbB2- und auch EGF-Rezeptoren.

Die erhöhte Anzahl von ErbB1-Homodimeren und ErbB1/ErbB2-Heterodimeren dürfte bei einem erhöhten Angebot von Wachstumsfaktoren, wie EGF und TGF α , eher zu einer Down-Regulation im Sinne eines Überangebots von Wachstumsfaktoren führen. Warum diese Down-Regulation sich als erstes in Bezug auf den ErbB4-mRNA-Gehalt bemerkbar macht, ist unklar.

Die bei BT-474, der Steroid-Rezeptor-positiven Zelllinie, nachweisbar erhöhte autokrine TGF α -Basis-Produktion könnte ein Grund dafür sein, dass BT-474 nicht mit einer Steigerung des ErbB4-mRNA-Gehaltes reagierte. Hier kam es im Gegenteil sogar zu einer Senkung der ErbB4-Expression. Ursache hierfür könnte die gänzlich andere Verteilung der ErbB-Rezeptoren bei BT-474 gegenüber T-47-D sein [110].

Erstaunlicherweise zeigten sich unter der TGF α -Inkubation - wie schon bei EGF- in beiden Zelllinien im mRNA-Gehalt eines wichtigen Erfolgsrezeptors dieses Wachstumsfaktors, dem ErbB1, keine Veränderungen. Offensichtlich führt das Angebot von Wachstumsfaktoren zuerst zu einer Veränderung der Expression anderer - in ErbB1-Heterodimeren eingebundener Rezeptoren - wie den ErbB2 und den ErbB4. Hierbei scheint der ErbB4-mRNA-Gehalt gegenüber Veränderungen des Angebots an Wachstumsfaktoren am empfindlichsten.

Auch bezüglich der ErbB2-Expression zeigten sich keine gravierenden Unterschiede unter TGF α -Inkubation. Jedoch fiel - wie schon für EGF - auch hier eine dem ErbB4-Level vergleichbare tendenzielle Reduktion des ErbB2-mRNA-Gehaltes bei BT-474 auf. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei T-47-D keine tendenziellen Veränderungen. Dies scheint insofern interessant, als dass BT-474 im Gegensatz zu T-47-D eine bedeutend höhere ErbB2-Expression aufweist, der ErbB2-Rezeptor aber bisher nicht als direkter Erfolgsrezeptor für TGF α nachgewiesen wurde. Demnach scheint eine Verbindung zum ErbB1-Rezeptor über entsprechend intrazelluläre Signaltransduktionswege denkbar.

Andererseits könnte die Stabilisierung der ErbB1/ErbB2-Heterodimere ebenfalls zu einer Down-Regulation von ErbB2 führen.

Innerhalb der Inkubationsversuche wurden Wachstumskurven ermittelt, die neben einer Wachstumskontrolle auch einen Bezug zu dem klinischen Parameter der Tumorzellproliferation in Abhängigkeit von den verwendeten Substanzen herzustellen vermochten. Dabei zeigten sich innerhalb der Zellproliferation keine gravierenden Veränderungen unter der Inkubation mit EGF und TGF α gegenüber der Kontrollkultur. Dies ist insofern verwunderlich, als für beide Substanzen eine wachstumsstimulierende Wirkung beschrieben wurde.

Verschiedenen neuere Studien wiesen sowohl wachstumsstimulierende als auch wachstumshemmende Wirkungen von EGF als auch von TGF α nach [57].

Imai et al. konnten bei der EGF-Inkubation von sieben verschiedenen Zelllinien - darunter auch T-47-D und BT-474 - sogar zeigen, dass EGF nur in besonders kleinen Dosen (0,1-1 ng/ml) und nur bei T-47-D zu einer nachweisbaren Wachstumsstimulation führte. Höhere Dosen zeigten keine Auswirkung bzw. teilweise sogar eine Hemmung der Zellproliferation [49].

Andere Studien konnten darüber hinaus nachweisen, dass EGF und TGF α in höheren Dosen nicht zur Wachstumsstimulation, sondern vielmehr zu einer verstärkten Zelldifferenzierung führten [26]. Die Daten der hier erhobenen Wachstumskurven unterstützen diese Ergebnisse.

Im zweiten Teil der Inkubationsversuche mit T-47-D und BT-474 wurde Suramin eingesetzt. Diese Substanz hemmt über heparinbindende Bindungsstellen unspezifisch die ErbB-Rezeptoren und somit die Wirkung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, darunter auch EGF und TGF α [31].

Die Inkubation mit Suramin konnte in keiner der beiden Konzentrationen - weder bei T-47-D noch bei BT-474 - eine eindeutige Veränderung des mRNA-Gehaltes der verschiedenen ErbB-Rezeptoren bewirken. Es kam aber zeitabhängig zu tendenziellen Veränderungen, die oftmals sogar gegenläufig waren.

Die Interpretation solch uneinheitlicher Ergebnisse erscheint schwierig. Ähnliche, ganz unterschiedliche Ergebnisse wurden schon in vorangegangenen Studien beschrieben.

So stellten beispielsweise M. Boylan et al. einen Effekt von Suramin auf die ErbB1-Expression fest. Dieser war jedoch je nach Zelllinie unterschiedlich und teilweise gegensätzlich [12].

Die deutlichsten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien waren bei der Untersuchung der ErbB1-Expression nach der 24-stündigen Inkubation mit 100 µg Suramin zu beobachten. Hierbei kam es bei T-47-D zu einer deutlichen Reduktion des ErbB1-mRNA-Gehaltes, bei BT-474 hingegen zu einer deutlichen Erhöhung.

Dies könnte auch hier mit der Existenz von autokrinen TGF α -Loops bei BT-474 zusammenhängen. D. Alexander et al. wiesen für Suramin und bestimmte Glucocorticoide eine hemmende Wirkung speziell auf diese autokrine TGF α -Produktion von Steroid-Rezeptor-negativen Zellen nach. Suramin bewirkte dabei eine dramatische Reduktion des TGF α -Levels in der Zell-Kultur [1]. Dies könnte bei BT-474 zu einer Hochregulierung der TGF α -bindenden ErbB1-Rezeptoren führen. Gleichzeitig wurde in derselben Arbeit auch nachgewiesen, dass die ErbB1-regulierte Mitogenese durch Suramin unbeeinflusst blieb.

Das spiegelt sich auch teilweise in den noch zu diskutierenden Wachstumskurven dieser Experimente wieder. Der normale bzw. reduzierte TGF α -Level bei T-47-D hingegen könnte der Grund dafür sein, dass Suramin hier eher zu einer kurzzeitigen Down-Regulation der ErbB1-Expression führte. Ein anderer Grund dafür wäre eine mögliche Stabilisierung des EGF-Rezeptors durch Suramin. Obwohl die Substanz den Rezeptor hemmt, wird die Anzahl der EGF-Rezeptoren durch die Stabilisierung der Rezeptoren relativ erhöht, da die Endozytose der Rezeptoren langsamer erfolgt. Dies wiederum könnte ebenfalls zu einer Down-Regulierung der ErbB1-Expression führen. Bei BT-474 zeigte sich jedoch eine Erhöhung des ErbB1-mRNA-Levels, demzufolge ein gegenteiliger Effekt. Der Grund ist wahrscheinlich in der gegenüber T-47-D sehr unterschiedlichen ErbB-Rezeptor-Verteilung zu suchen. Diese These kann aber gerade unter dem Blickwinkel der sonst sehr uneinheitlichen Ergebnisse nicht klar belegt werden. Vielmehr unterstützen diese Ergebnisse einmal mehr, dass die Wirkung von Suramin je nach Zelltyp und Inkubationszeit sehr unterschiedlich sein kann. Auf die Expression des derzeit klinisch relevantesten Mitgliedes der ErbB-Familie, den ErbB2, zeigte Suramin letztlich kaum eine Wirkung. Somit bleibt der klinische Nutzen einer Suramin-Therapie - wie auch schon durch Mirza et al. anhand klinischer Daten dokumentiert – fragwürdig [70].

Der ErbB4 scheint bei der Wirkung von Suramin keine gesonderte Rolle zu spielen. Vielmehr entsteht der Eindruck, dass der ErbB4-mRNA-Gehalt ähnlich gegensätzlichen Veränderungen wie der mRNA-Gehalt der übrigen ErbB-Rezeptoren unterliegt.

In Ergänzung dieser Ergebnisse auf mRNA-Ebene der ErbB-Rezeptoren zeigte sich bei der Betrachtung der Wachstumskurve von T-47-D vor allem unter der Inkubation mit 100 µg

Suramin über 6 Tage eine eindeutige Hemmung der Zell-Proliferation. Das Zellwachstum war ohne Suramin doppelt so stark wie unter 100 µg Suramin.

BT-474 zeigte sich hingegen bedeutend unsensibler gegenüber Suramin. Hier konnte unter beiden Suramin-Konzentrationen keine deutliche Veränderung des Zellwachstums gegenüber der Kontrollkultur beobachtet werden.

BT-474 wurde schon in anderen Studien gegenüber äußeren Einflüssen - beispielsweise hormoneller Art - als unsensibler im Vergleich zu weniger aggressiveren Zelllinien wie T-47-D beschrieben [101] [49]. Bai et al. konnten bei der Untersuchung von sechs verschiedenen Tumor-Zelllinien nur bei einer von fünf Zelllinien eine Reduktion des Zellwachstums unter einer Inkubation mit 100 µg Suramin registrieren [4].

Die hier beobachteten unterschiedlichen Reaktionen der beiden Zelllinien in ihrem Wachstum unter Suramin unterstützen die uneinheitliche Wirkung von Suramin. Hierbei scheinen nicht nur gänzlich unterschiedliche Tumortypen, sondern auch Subklassen des gleichen Mammakarzinom-Typs unterschiedlich zu reagieren. Der Grund für diese Unterschiede bleibt allerdings ungeklärt.

Auch unter der Inkubation mit CGS, einer Substanz, welche die bei der Tumordinvasion wichtigen Metallo-Proteinasen hemmt, konnten Unterschiede in der ErbB-Expression der beiden Zelllinien T-47-D und BT-474 beobachtet werden.

Diese Unterschiede zeigten sich unter CGS erstaunlicherweise vor allem in der ErbB4-Expression. Hierbei kam es bei T-47-D nach einer 24-stündigen Inkubation mit CGS zu einer deutlichen Erhöhung des mRNA-Gehaltes. Bei BT-474 kam es hingegen unter gleichen Bedingungen zu einer deutlichen Erniedrigung des ErbB4-mRNA-Gehaltes. Xu et al. entdeckten in diesem Zusammenhang, dass Heregulin, ein Ligand des ErbB4, die Expression der Metallo-Proteinase 9 (MMP9) zu steigern vermag.

Der ErbB2-Antikörper ID5 hingegen - ein direkter Agonist des ErbB2-Rezeptors - bewirkte diese Steigerung nicht in dem Maße wie unter Heregulin beschrieben.

Der ErbB4 könnte demnach ein nicht unwichtiger Regelmechanismus für die MMP-Expression sein [106].

MMP9 wird neben MMP1 und MMP3 auch durch CGS gehemmt. Folglich könnte die Erhöhung des ErbB4-mRNA-Levels bei T-47-D mit der verringerten Aktivität von MMP9 in Zusammenhang stehen.

Es könnte demnach sein, dass Heregulin durch die Aktivierung des ErbB4-Rezeptors indirekt oder direkt die MMP9-Expression zu steigern vermag. Eine Hemmung der

Metallo-Proteinasen durch CGS beispielsweise könnte demnach eine konsekutiv erhöhte ErbB4-Expression zur Folge haben. Dieser Regelkreis würde die MMP9-Expression steigern und so einer Hemmung entgegen wirken. Insbesondere T-47-D könnte sich dieses Signal-Transduktions-Weges bedienen, da der ErbB4-Rezeptor in hohem Maße in dieser Zelllinie exprimiert wird.

Demgegenüber besitzt BT-474 eine nur geringe ErbB4-Expression, im Gegensatz dazu jedoch eine besonders ausgeprägte ErbB2-Expression. Die Signalwege, welche der Hemmung der MMP's durch Metallo-Proteinasen-Hemmer entgegen wirken, könnten hier eher ErbB2 vermittelt sein. Der ErbB2 kann ebenfalls indirekt durch Heregulin mittels der ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren aktiviert werden. Wahrscheinlich aufgrund der an sich schon hohen ErbB2-Expression blieb der ErbB2-Level bei BT-474 gleich, im Gegensatz dazu stieg die ErbB2-Expression von T-47-D nach einer 24-stündigen Inkubation mit CGS leicht an. Der ErbB4-mRNA-Gehalt in BT-474 sank sogar unter der Inkubation mit CGS. Dies mag an der gegenüber T-47-D gänzlich anderen ErbB-Rezeptor-Verteilung liegen. Codony-Servat et al. konnten in ihren Untersuchungen in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass die proteolytische Spaltung an der extrazellulären Domäne des ErbB2 nach Liganden-Bindung, welche der ErbB2 im Gegensatz zu den anderen ErbB-Rezeptoren durchlaufen muss, unter anderem durch MMP's reguliert wird.

Es zeigte sich hierbei, dass die Hemmung von MMP1 diesen Prozess verzögerte. Die Hemmung von MMP2 zeigte hingegen keine Auswirkungen [20]. MMP1 wird ebenso durch CGS gehemmt. Es wäre demnach denkbar, dass CGS aufgrund einer Hemmung der proteolytischen Spaltung zwischen Rezeptor und Ligand die Rezeptor-Liganden-Bindung stabilisiert. Dies könnte eine Downregulation des ErbB2 zur Folge haben. Ein solcher Effekt war jedoch bei einer 24-stündigen Inkubation angesichts des hohen ErbB2-Expressions-Level noch nicht zu beobachten. Dagegen wurde eine Senkung der ErbB4-Expression registriert, welche durch die Stabilisierung des ErbB2-Heterodimers ebenfalls möglich wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der ErbB4 sich unter der CGS-Inkubation änderte und demnach – auch in Hinblick auf die von Xu et al. erhobenen Daten - eine Rolle bei der Regulation der MMP-Expression spielen könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgestellten Arbeit wurde die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB4 hinsichtlich ihrer pathophysiologischen, prognostischen und therapeutischen Bedeutung für das Mammakarzinom untersucht.

Die Expression von ErbB4 konnte in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien und in Gewebeproben von Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der ErbB4-Expression in Proben aus dem Tumorgewebe mit Gewebeproben aus den korrespondierenden Resektionsrändern ergab, dass in 11% der 36 Tumoren eine Erhöhung, in 33% eine Verringerung und davon in 19% keine ErbB4-Expression festzustellen war.

In 55% war der ErbB4 mRNA-Level in Tumor- und Nichttumor-Gewebe vergleichbar.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem ErbB4-mRNA-Gehalt und der ErbB1- oder ErbB2-Expression konnte nicht gefunden werden.

Die Höhe der ErbB4 Expression schien jedoch insbesondere mit dem Stadium und dem Malignitätsgrad des jeweiligen Tumors in Beziehung zu stehen. So zeigte sich, dass der ErbB4-Gehalt bei Tumoren in einem frühen Tumorstadium oder mit einem niedrigen Malignitätsgrad tendenziell erhöht war. Der ErbB4 könnte demnach bei der Prognostik von Mammakarzinomen eine Hilfe darstellen. Diese auffallenden Tendenzen bedürfen der Bestätigung an einem größeren Probenkollektiv.

Eine signifikante Korrelation der ErbB4-Expression zu anderen klinischen oder pathologischen Parametern konnte nicht nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen entstand die Frage, ob die ErbB4-Expression durch Wachstumsfaktoren, die bei der Pathogenese des Mammakarzinoms von Bedeutung sind, sowie durch therapeutische Substanzen beeinflusst werden kann. Dazu wurden hormonsensitive (T-47-D) und hormoninsensitive Mammakarzinom-Zelllinien (BT-474) mit den Wachstumsfaktoren EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) und TGF α (Wachstumsfaktor alpha) sowie mit dem pleiotrop rezeptorinhibierenden Suramin und dem Metalloproteinase-Inhibitor CGS 27023A in dosis- und zeitabhängiger Weise inkubiert und die Expression von ErbB4 bestimmt.

In der Östrogen-Rezeptor positiven und somit hormonsensiblen Zelllinie T-47-D konnte eine erhöhte ErbB4-Expression, in der Östrogen-Rezeptor negativen Zelllinie BT-474 im Gegensatz dazu eine verringerte ErbB4-Expression und eine erhöhte ErbB2-Expression nachgewiesen werden.

Die Expression von ErbB4 in T-47-D wurde durch den Wachstumsfaktor EGF in verwendeter Konzentration nicht beeinflusst, in der Zelllinie BT-474 hingegen zeitabhängig tendenziell gehemmt.

Der EGF-verwandte Wachstumsfaktor TGF α führte in der Östrogen-Rezeptor positiven Zelllinie T-47-D zu einer deutlich zeitabhängigen Erhöhung des ErbB4-mRNA-Niveaus. Im Gegensatz hierzu bewirkte TGF α in der Östrogen-Rezeptor negativen Zelllinie eine tendenzielle Reduktion des ErbB4-mRNA Gehaltes.

Innerhalb der parallel zu den Versuchen durchgeführten Bestimmung der Wachstumskurve der Zellkulturen zeigte sich, dass weder EGF noch TGF α in verwendeter Konzentration die Wachstumsrate der Tumorzellen signifikant zu beeinflussen vermögen.

Der Metallo-Proteinase-Hemmer CGS erhöhte die ErbB4-Expression in der Östrogen-Rezeptor positiven Zelllinie T-47-D. Demgegenüber verringerte sich die ErbB4-Expression der Östrogen-Rezeptor negativen Zelllinie BT-474 unter CGS-Einfluß.

Die Inkubation mit Suramin, einem unspezifischen Hemmstoff von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, führte sowohl bei der ErbB4-Expression als auch bei der ErbB1- und ErbB2-Expression zu uneinheitlichen Ergebnissen. Die Wachstumsrate zeigte bei T-47-D unter Suramin-Einwirkung einen deutlichen Abfall. BT-474 hingegen war gegenüber Suramin resistenter.

Neben der ErbB4-Expression wurde die Expression von ErbB1 und ErbB2 ermittelt. Weder durch die Wachstumsfaktoren EGF und TGF α noch durch den Metallo-Proteinase-Hemmer CGS kam es in der verwendeten Konzentration zu einer signifikanten Änderung der ErbB1- oder ErbB2-Expression.

Eine Interpretation dieser vielfältigen Ergebnisse ist schwierig, da bisher kaum Veröffentlichungen, welche sich in ähnlicher Form mit dem ErbB4-Rezeptor auseinandersetzen, existieren.

Der ErbB4-Rezeptor spielt offenbar in der Initialphase der Tumorentwicklung eine besondere Rolle. Eine erhöhte ErbB4-Expression scheint demnach auf ein frühes Tumorstadium hinzudeuten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der ErbB4 Rezeptor bei der Tumorentwicklung des Mammakarzinoms als positiver prognostischer Marker interpretiert werden könnte.

Um letztendlich die Wertigkeit der Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB4 beim Mammakarzinom zu objektivieren, sind noch weitere Arbeiten mit einem größeren Probenkollektiv notwendig.

6. ANHANG

6.1. Literaturverzeichnis

1. **Alexander DB, Goya L, Webster MK, et al.** Glucocorticoids coordinately disrupt a transforming growth factor alpha autocrine loop and suppress the growth of 13762NF-derived Con8 rat mammary adenocarcinoma cells. Cancer Res 1993; 53(8):1808-15
2. **Allred DC, Elledge R, Clark GM, Fuqua SA.** The p53 tumor-suppressor gene in human breast cancer. Cancer Treat Res 1994; 71:63-77
3. **Bacus SS, Yarden Y, Oren M, et al.** Neu differentiation factor (Heregulin) activates a p53-dependent pathway in cancer cells. Oncogene 1996; 12(12):2535-47
4. **Bai LY, Miyazaki M, Namba M.** Effects of suramin on cell proliferation of various types of human malignant cells. Gan To Kagaku Ryoho 1991; 18(3):387-91
5. **Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA.** Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. Cell 1986; 45(5):649-57
6. **Bargmann CI, Weinberg RA.** Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. Embo J 1988; 7(7):2043-52
7. **Basilico C, Moscatelli D.** The FGF family of growth factors and oncogenes. Adv Cancer Res 1992; 59:115-65
8. **Becker-Andre M, Hahlbrock K.** Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). Nucleic Acids Res 1989; 17(22):9437-46
9. **Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, et al.** Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. Mol Cell Biol 1995; 15(12):6496-505
10. **Borg A, Baldetorp B, Ferno M, et al.** ERBB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. Oncogene 1991; 6(1):137-43
11. **Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, et al.** Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. Br J Cancer 1989; 59(6):943-7
12. **Boylan M, van den Berg HW, Lynch M.** The anti-proliferative effect of suramin towards tamoxifen-sensitive and resistant human breast cancer cell lines in relation to expression of receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I: growth stimulation in the presence of tamoxifen. Ann Oncol 1998; 9(2):205-11
13. **Brodowicz T, Wiltshcke C, Budinsky AC, et al.** Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. Int J Cancer 1997; 73(6):875-9

14. **Brown RW.** Prognostic significance and clinical-pathological Correlation of cell-cycle kinetics measured by Ki-67 immunocytochemistry in axillary node-negative carcinoma of the breast. Breast Cancer Res Treat 1990; 16:192
15. **Cailleau R, Olive M, Cruciger QV.** Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro 1978; 14(11):911-5
16. **Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM.** Progesterone receptor expression in meningiomas. Cancer Res 1993; 53(6):1312-6
17. **Castiglioni T, Elsner B, Curutchet HP, et al.** Immunohistochemical analysis of p53 and c-erbB-2 in breast cancer. Medicina (B Aires) 1995; 55(5 Pt 1):415-20
18. **Chrysogelos SA, Yarden RI, Lauber AH, Murphy JM.** Mechanisms of EGF receptor regulation in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 1994; 31(2-3):227-36
19. **Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al.** Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. J Clin Oncol 1999; 17(9):2639
20. **Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, et al.** Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. Cancer Res 1999; 59(6):1196-201
21. **Cohen BD, Green JM, Foy L, Fell HP.** HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Evidence for HER1-HER4 heterodimers. J Biol Chem 1996; 271(9):4813-8
22. **Culotta E, Koshland DE, Jr.** p53 sweeps through cancer research [published erratum appears in Science 1994 apr 1;264(5155):16]. Science 1993; 262(5142):1958-61
23. **Daly RJ, King RJ, Darbre PD.** Interaction of growth factors during progression towards steroid independence in T-47-D human breast cancer cells. J Cell Biochem 1990; 43(3):199-211
24. **Daly RJ, Darbre PD.** Cellular and molecular events in loss of estrogen sensitivity in ZR-75-1 and T-47-D human breast cancer cells. Cancer Res 1990; 50(18):5868-75
25. **Darcy KM, Wohlhueter AL, Zangani D, et al.** Selective changes in EGF receptor expression and function during the proliferation, differentiation and apoptosis of mammary epithelial cells. Eur J Cell Biol 1999; 78(7):511-23
26. **Dickson RB, Lippman ME.** Growth factors in breast cancer. Endocr Rev 1995; 16(5):559-89
27. **Dougall WC, Qian X, Peterson NC, et al.** The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. Oncogene 1994; 9(8):2109-23

28. **Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al.** Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 1984; 307(5951):521-7
29. **Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H.** Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. Breast Cancer Res Treat 1995; 35(1):115-32
30. **Elenius K, Corfas G, Paul S, et al.** A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. J Biol Chem 1997; 272(42):26761-8
31. **Foekens JA, Sieuwerts AM, Stuurman-Smeets EM, et al.** Effects of suramin on cell-cycle kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. Br J Cancer 1993; 67(2):232-6
32. **Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, et al.** Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol Cell Biol 1986; 6(3):955-8
33. **Fung YK, A TA.** The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. Cancer Treat Res 1992; 61:59-68
34. **Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, et al.** Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor [see comments]. Nature 1995; 378(6555):390-4
35. **Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL.** Growth factors and cancer. Cancer Res 1986; 46(3):1015-29
36. **Graeff H.** Prognostische und therapierelevante Faktoren beim Mammakarzinom. Der Onkologe 1997; 3:409-12
37. **Groenen LC, Walker F, Burgess AW, Treutlein HR.** A model for the activation of the epidermal growth factor receptor kinase involvement of an asymmetric dimer? Biochemistry 1997; 36(13):3826-36
38. **Grooteclaes M, Pasleau F, Dijkmans H, et al.** The 6-kilobase c-erbB2 promoter contains positive and negative regulatory elements functional in human mammary cell lines. Cancer Res 1994; 54(15):4193-9
39. **Grooteclaes M, Vernimmen D, Plaza S, et al.** A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells. Cancer Res 1999; 59(11):2527-31
40. **Grunt WT, Huber H.** The Family of c-erbB Genes: From Basic Research to Clinical Oncology. Onkologie 1994; 17:346-357
41. **Guerin M, Gabillot M, Mathieu MC, et al.** Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. Int J Cancer 1989; 43(2):201-8

42. **Gullick WJ.** The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. Int J Cancer Suppl 1990; 5:55-61
43. **Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, et al.** Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. Int J Cancer 1988; 42(6):842-5
44. **Han X, Kasahara N, Kan YW.** Ligand-directed retroviral targeting of human breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(21):9747-51
45. **Harris AL.** What is the biological, prognostic, and therapeutic role of the EGF receptor in human breast cancer? Breast Cancer Res Treat 1994; 29(1):1-2
46. **Heldin CH, Westermark B.** Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 1984; 37(1):9-20
47. **Hermanek P.** Prognostic faktors in cancer. Springer 1995; Berlin, Heidelber, New York
48. **Hoffmann W.** Genetische Prdisposition beim Mammakarzinom. Der Onkologe 1998; 4:868-77
49. **Imai Y, Leung CK, Friesen HG, Shiu RP.** Epidermal growth factor receptors and effect of epidermal growth factor on growth of human breast cancer cells in long-term tissue culture. Cancer Res 1982; 42(11):4394-8
50. **Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ.** The prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR), C-erbB-2, Ki-67 and PCNA expression in breast cancer. Anticancer Res 1996; 16(5B):3141-7
51. **Ito I, Yoshimoto M, Iwase T, et al.** Association of genetic alterations on chromosome 17 and loss of hormone receptors in breast cancer. Br J Cancer 1995; 71(3):438-41
52. **Karunagaran D, Tzahar E, Liu N, et al.** Neu differentiation factor inhibits EGF binding. A model for trans-regulation within the ErbB family of receptor tyrosine kinases. J Biol Chem 1995; 270(17):9982-90
53. **Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al.** ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. Embo J 1996; 15(2):254-64
54. **Kawamoto T, Mendelsohn J, Le A, et al.** Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells. J Biol Chem 1984; 259(12):7761-6
55. **Keydar I, Chen L, Karby S, et al.** Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur J Cancer 1979; 15(5):659-70
56. **King CR, Kraus MH, Aaronson SA.** Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. Science 1985; 229(4717):974-6

57. **Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA.** The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocr Rev 1992; 13(1):3-17
58. **Knowlden JM, Gee JM, Seery LT, et al.** c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. Oncogene 1998; 17(15):1949-57
59. **Koga M, Musgrove EA, Sutherland RL.** Differential effects of phorbol ester on epidermal growth factor receptors in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. Cancer Res 1990; 50(16):4849-55
60. **Kornblum HI, Zurcher SD, Werb Z, et al.** Multiple trophic actions of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in the central nervous system. Eur J Neurosci 1999; 11(9):3236-3246
61. **Kumar R, Mandal M, Ratzkin BJ, et al.** NDF induces expression of a novel 46 kD protein in estrogen receptor positive breast cancer cells. J Cell Biochem 1996; 62(1):102-12
62. **Lacroix H, Iglehart JD, Skinner MA, Kraus MH.** Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. Oncogene 1989; 4(2):145-51
63. **Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES.** Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. J Natl Cancer Inst 1978; 61(4):967-78
64. **Lax I, Bellot F, Howk R, et al.** Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. Embo J 1989; 8(2):421-7
65. **Li B, Rosen JM, McMenamin-Balano J, et al.** neu/ErbB2 cooperates with p53-172h during mammary tumorigenesis in transgenic mice. Mol Cell Biol 1997; 17(6):3155-63
66. **Lupu R, Colomer R, Kannan B, Lippman ME.** Characterization of a growth factor that binds exclusively to the erbB-2 receptor and induces cellular responses. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(6):2287-91
67. **MacLeod CL.** EGF induces cell cycle arrest of A 431 human epidermoid carcinoma cells. Cell Physiol 1986; 127:175-82
68. **Marchionni MA.** Cell-cell signalling. neu tack on neuregulin [news; comment]. Nature 1995; 378(6555):334-5
69. **Marx D, Schauer A, Reiche C, et al.** c-erbB2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1990; 116(1):15-20

70. **Mirza MR, Jakobsen E, Pfeiffer P, et al.** Suramin in non-small cell lung cancer and advanced breast cancer. Two parallel phase II studies. Acta Oncol 1997; 36(2):171-4
71. **Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, et al.** Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. Cell 1988; 54(1):105-15
72. **Naidu R, Yadav M, Nair S, Kutty KK.** Immunohistochemical analysis of p53 expression in primary breast carcinomas. Anticancer Res 1998; 18(1A):65-70
73. **Opfermann M, Brugal G, Vassilakos P.** Cytometry of breast carcinoma: significance of ploidy balance and proliferation index. Cytometry 1987; 8(2):217-24
74. **Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WAd, McGuire WL.** The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Cancer 1980; 46(12 Suppl):2884-8
75. **Paik S, Hazan R, Fisher ER, et al.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. J Clin Oncol 1990; 8(1):103-12
76. **Pantel K, von Knebel Doeberitz M.** Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells (Opin Oncol 2000 Jan). Curr 2000; 12(1):95-101
77. **Paridaens R, Sylvester RJ, Ferrazzi E, et al.** Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer. Cancer 1980; 46(12 Suppl):2889-95
78. **Peles E, Ben-Levy R, Tzahar E, et al.** Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hereregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. Embo J 1993; 12(3):961-71
79. **Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, et al.** Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. Nature 1993; 366(6454):473-5
80. **Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, et al.** Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(5):1746-50
81. **Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP.** ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. Eur J Cancer 1998; 34(6):791-808
82. **Riese DJ, 2nd, Bermingham Y, van Raaij TM, et al.** Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. Oncogene 1996; 12(2):345-53
83. **Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, et al.** Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. J Pathol 1999; 187(2):207-16

84. **Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, et al.** Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. Lancet 1987; 1(8547):1398-402
85. **Savage CR, Jr., Inagami T, Cohen S.** The primary structure of epidermal growth factor. J Biol Chem 1972; 247(23):7612-21
86. **Sawyer C, Hiles I, Page M, et al.** Two erbB-4 transcripts are expressed in normal breast and in most breast cancers. Oncogene 1998; 17(7):919-24
87. **Scott GK, Daniel JC, Xiong X, et al.** Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. J Biol Chem 1994; 269(31):19848-58
88. **Shak S.** Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. Semin Oncol 1999; 26(4 Suppl 12):71-7
89. **Siegall CB, Bacus SS, Cohen BD, et al.** HER4 expression correlates with cytotoxicity directed by a heregulin-toxin fusion protein. J Biol Chem 1995; 270(13):7625-30
90. **Silverberg E, Boring CC, Squires TS.** Cancer statistics, 1990 [see comments]. CA Cancer J Clin 1990; 40(1):9-26
91. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235(4785):177-82
92. **Speiser P, Sliutz G, Zeillinger R, et al.** Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid receptors, tumor stage, grading and menopausal status. Geburtshilfe Frauenheilkd 1992; 52(6):355-9
93. **Suo Z, Emilsen E, Tveit KM, Nesland JM.** Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. Histopathology 1998; 33(6):514-21
94. **Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, et al.** ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. Cancer Res 1995; 55(22):5400-7
95. **Tang CK, Concepcion XZ, Milan M, et al.** Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo [In Process Citation]. Cancer Res 1999; 59(20):5315-22
96. **Toikkanen S, Kujari H.** Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow-up. Hum Pathol 1989; 20(8):758-64
97. **Vogt U, Bielawski K, Schlotter CM, et al.** Amplification of erbB-4 oncogene occurs less frequently than that of erbB-2 in primary human breast cancer. Gene 1998; 223(1-2):375-80

98. **Wan CW, McKnight MK, Brattain DE, et al.** Different epidermal growth factor growth responses and receptor levels in human colon carcinoma cell lines. Cancer Lett 1988; 43(1-2):139-43
99. **Wang LM, Kuo A, Alimandi M, et al.** ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(12):6809-14
100. **Wang Z, Zhang L, Yeung TK, Chen X.** Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. Mol Biol Cell 1999; 10(5):1621-36
101. **Warri AM, Isola JJ, Harkonen PL.** Anti-oestrogen stimulation of ERBB2 ectodomain shedding from BT-474 human breast cancer cells with ERBB2 gene amplification. Eur J Cancer 1996; 32A(1):134-40
102. **Wen D, Peles E, Cupples R, et al.** Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. Cell 1992; 69(3):559-72
103. **Wingren S, Stal O, Nordenskjold B.** Flow cytometric analysis of S-phase fraction in breast carcinomas using gating on cells containing cytokeratin. South East Sweden Breast Cancer Group. Br J Cancer 1994; 69(3):546-9
104. **Wosikowski K, Schuurhuis D, Kops GJ, et al.** Altered gene expression in drug-resistant human breast cancer cells. Clin Cancer Res 1997; 3(12 Pt 1):2405-14
105. **Wrann MM, Fox CF.** Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line. J Biol Chem 1979; 254(17):8083-6
106. **Xu FJ, Stack S, Boyer C, et al.** Heregulin and agonistic anti-p185(c-erbB2) antibodies inhibit proliferation but increase invasiveness of breast cancer cells that overexpress p185(c-erbB2): increased invasiveness may contribute to poor prognosis. Clin Cancer Res 1997; 3(9):1629-34
107. **Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al.** Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986; 319(6050):230-4
108. **Yamauchi H, A ON, Gelman R, et al.** Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. J Clin Oncol 1997; 15(7):2518-25
109. **Yarden RI, Lauber AH, El-Ashry D, Chrysogelos SA.** Bimodal regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen in breast cancer cells. Endocrinology 1996; 137(7):2739-47

110. **Zajchowski D, Band V, Pauzie N, et al.** Expression of growth factors and oncogenes in normal and tumor-derived human mammary epithelial cells. Cancer Res 1988; 48(24 Pt 1):7041-7
111. **Zhang K, Sun J, Liu N, et al.** Transformation of NIH 3T3 cells by HER3 or HER4 receptors requires the presence of HER1 or HER2. J Biol Chem 1996; 271(7):3884-90

6.2. Material für die Zellkultivierung

- Gewebekulturflaschen klein a 50 ml, CELLSTAR, Firma GREINER-Labortechnik
- Gewebekulturflaschen groß a 250 ml, CELLSTAR, Firma GREINER-Labortechnik
- Eppendorfpipettenset mit passenden Spitzen
- Sterilbank, frisch gesäubert
- Pipettierhilfe PIPETUS-Akku der Firma HIRSCHMANN + passende Saugpipetten
- Wasserbad 37°C
- 15 ml FALCON-Röhrchen
- Zentrifuge der Firma HETTICH-UNIVERSAL 30 RF
- Wischtücher mit Reinigungssubstanz: Pharmacidol (Serumwerk Bernburg)
- Kryoröhrchen
- Stickstoffaufbewahrungsbehälter
- HERAEUS- Brutschrank Typ BB 6220
- Cultur Counter (Zellzahl)

Verwendete Zelllinien

BT-474 :

Morphologie: adhärente Zellrasen bildend

Karyotyp: hypertetraploid

Wachstum: Monolayer

Kulturmedium: **90% RPMI 1640 + 10% FCS**

Immunologische Analyse: Zytokeratin positiv

Vimentin, Desmin, Endothel und Neurofilament negativ

Wachstumsbedingungen: 37° C ; 5% CO₂ ; Wasserdampfsättigung

Steroidrezeptoren: negativ

Besonderheit: deutliche ErbB2-Expression

Während der Anzüchtung der Zellen erfolgte jeden 2.Tag ein Mediumwechsel sowie alle 5-8 Tage eine 1:2 bis 1:3 Aufteilung.

T-47 D:

Morphologie: adhärenente Zellen

Karyotyp: hypotriploid

Wachstum: Monolayer

Kulturmedium: **90% RPMI 1640 + 10% FCS**

Wachstumsbedingungen: 37° C ; 5% CO₂ ; Wasserdampfsättigung

Steroidrezeptoren: positiv

Besonderheit: deutliche ErbB4-Expression

Auch hier wurde alle 2 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Aufgrund der schnellen Zellteilung und des kontinuierlichen Wachstums konnte alle 4-6 Tage eine Aufteilung der Zellen in einem Verhältnis von 1:5 vorgenommen werden.

MDA- MB 435S:

Morphologie: adhärenente Zellen

Karyotyp: Modalzahl 64

Wachstum: Monolayer

Kulturmedium: **85% RPMI 1640 + 15% FCS**

Wachstumsbedingungen: 37° C ; 5% CO₂ ; Wasserdampfsättigung

Steroidrezeptoren: negativ

Nach zunächst problemloser Anzüchtung der Zellen mit regelmäßigem Mediumwechsel und Aufteilung aller 3-4 Tage zeigte sich nach längerer Kultivierung eine deutlich verringerte Zellteilungsgeschwindigkeit, so dass ein Splitten (trotz aller 2 Tage stattfindenden Mediumwechsels) von 1:2 nur noch alle 8-10 Tage möglich war.

6.3. Verwendete Lösungen

PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Zusammensetzung:

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,4 g Na ₂ HPO ₄
0,24 g KH ₂ PO ₄
in 800 ml destilliertem Wasser

- Eingestellter pH-Wert auf 7,4 (mittels HCl und Wasser auf einen Liter)
- Die Lösung wurde auf Aliquots verteilt und im Autoklaven für 20 min sterilisiert
- Lagerung bei Zimmertemperatur

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Firma: Gibco BRL
Life Technologies GmbH
Technologiepark Karlsruhe
Emmy-Nother-Str. 10
76131 Karlsruhe

Zusammensetzung: -Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (1x)
((Flüssig (High Glucose))
-Glutamax TM (L-Alanyl-L-Glutamine
-4500 mg/l D-Glukose
- Natriumpyruvat

Medium (RPMI 1640)

1x Zellkulturmedium Flüssig mit Glutamax TM

der Firma Gibco BRL

Life Technologies Karlsruhe

Bestehend aus: - versch. anorganischen Salzen
- D-Glukose
- Gluthation (reduziert)
- HEPES
- Phenolrot
- versch. Aminosäuren
- versch. Vitamine

Mediumgemisch zum Einfrieren der Zellen

- 70 %iges Medium (RPMI 1640) ohne FCS
- 20 %iges FCS
- 10 %iges DMSO

6.4. Material für die RNA - Isolierung mit RNeasy

Tumorzellen bzw. Zellkulturzellen

Rneasy Spin Columns

1.5 ml Collection Tubes

2.0 ml Collection Tubes

Wash Buffer RW 1

Wash Buffer RPE

DEPC – H₂O

RTL - Lysepuffer (8ml):

6.5. Material für c-DNA Synthese

Gesamt – RNA

Reaktionsgefäße

Reaktionspuffer :

	Tris – HCl	250 mM (pH 8.3 .)
	KCl	375 mM
	MgCl ₂	15 mM
	DTT	100 mM
	Oligo – dT	0,2 mg/ml (1.6 µg / 20 µl)
ODER	Random hexamer primer	3,2 µg / 20 µl
	Mix dNTP – Stammlösung :	
	(dATP , dGTP , dTTP)	2,5 mM
	Rnasin	40 U/µl
	M – MLV Reverse Transkriptase	200 U/µl
	DEPC – Wasser	

Reaktions-Mix :

Reaktionspuffer	4 µl
DTT	2 µl
Oligo – dT – Primer	2 µl
ODER	
random primer	2 µl
dNTP – Mix	2 µl
Rnasin (20 U)	0,5 µl
M – MLV Reverse Transkriptase	1 µl

6.6. Material für RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit einem Thermocycler der Firma BIOMETRA durchgeführt.

pro PCR – Reaktionsgefäß 0,5 ml

wurde benötigt :

- c – DNA: 1µl

- Reaktionsmix (Gesamtvolumen 25 µl):

+ 10 x PCR – Reaktions Puffer :	2,5	µl
(KCl	500	mM
Tris HCl	pH 8,3	RT
MgCl ₂	15	mM
Triton X – 100	1	%)
+ NTP – Mix	2	µl
+ Primer	1	µl
+ Tag – Polymerase (5 U / µl)	0,2	µl
+ steriles Wasser	18,3	µl
-Mineralöl	1	Tropfen

6.7. Material für die Gelelektrophorese

1 Elektrophoresekammer

1 Elektrophoresewanne

2 Kämme zur Taschenbildung

2 Gummiabdichtungen

1 Eppendorfpipette mit passenden Spitzen

1 Mikrowelle

1 Flasche zum Aufkochen der Agarose

Agarose

Ladungspuffer

Laufpuffer (1xTAE)

Ethidiumbromid

Reaktionsgefäße mit DNA als PCR-Produkt

1 Marker

1 Kontrollprobe

DNA- Ladungspuffer (Ansatz für 100 ml):

- 1 ml 10mM Tris-HCL, pH 8,0
- 200µl 1 mM NA₂-EDTA
- 500µl 0,1% SDS (Natriumdesoxycholat)
- 30 ml 30% Glycerin
- 62,5µl 0,0025% Bromphenolblau
- den Rest mit Aqua-dest. Auf 100 ml auffüllen

Laufpuffer (Ansatz für 1000 ml) :

- 20 ml 50x TAE
- 980 ml Aqua-dest.

TAE und Laufpuffer mussten gut miteinander vermischt werden.

Zusammensetzung von 50x TAE:

242 g	TRIS base
571 g = 57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ethidiumbromid:

- auch 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid
- organischer Farbstoff mit planarer Struktur
- kann mit DNA interkalieren
- Anregung durch UV-Licht (254-366nm) möglich, dadurch Emission von Licht im orange-roten Bereich (590 nm)
- bei Bindung an DNA wird eine Verstärkung der Fluoreszenz bewirkt

6.8. Zeitlicher Ablauf eines Inkubationsversuches

Tabelle 6.1.

Tag	Zelllinie	benötigte Zellkulturflaschen	Vorgehensweise
Dienstag Tag 0	T-47-D	38 kl.Fl.	1 x 10 hoch 6 aussähen und mit 15%-igen Medium versetzen
Mittwoch Tag 1	T-47-D	30 kl. Fl. 6 kl. Fl. 2 kl. Fl. = 38 kl. Fl.	MW mit serumfreien Medium MW mit 15%-igen Medium zählen, lysieren, RNA – Isolierung
Donnerstag Tag 2	T-47-D	3 x 2 kl. Fl. 3 x 2 kl. Fl. 3 x 2 kl. Fl. 3 x 2 kl. Fl. 3 x 2 kl. Fl. 3 x 2 kl. Fl. --> 6 kl. Fl. jeweils = 3 x 12 kl. Fl.	MW mit 15%-igen Medium MW mit serumfreien Medium m.S.; + 10 µg/ml Suramin m.S.; + 100 µg/ml Suramin o.S.; + 50 ng/ml EGF o.S.; + 20 ng/ml TGF a
Freitag Tag 3	T-47-D	2 kl. Fl. :m.S. 2 kl. Fl. : o.S. 2 kl. Fl. :m.S.; + 10 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. :m.S.; + 100 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. : o.S.; + 50 ng/ml EGF 2 kl. Fl. : o.S.; + 20 ng/ml TGF a = 12 kl. Fl.	zählen, lysieren, RNA – Isolierung zählen, lysieren, RNA – Isolierung zählen, lysieren, RNA – Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung
Samstag Tag 4	T-47-D	2 x 2 kl. Fl. :m.S. 2 x 2 kl. Fl. : o.S. 2 x 2 kl. Fl. :m.S.; + 10 µg/ml Suramin 2 x 2 kl. Fl. :m.S.; + 100 µg/ml Suramin 2 x 2 kl. Fl. : o.S.; + 50 ng/ml EGF 2 x 2 kl. Fl. : o.S.; + 20 ng/ml TGF a 2 x 12 kl. Fl.=24 kl. Fl.	MW mit 15%-igen Medium MW mit serumfreien Medium MW m.S.; + 10 µg/ml Suramin MW m.S.; + 100 µg/ml Suramin MW o.S.; + 50 ng/ml EGF MW o.S.; + 20 ng/ml TGF a
Sonntag Tag 5	T-47-D	2 kl. Fl. :m.S. 2 kl. Fl. : o.S. 2 kl. Fl. :m.S.; + 10 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. :m.S.; + 100 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. : o.S.; + 50 ng/ml EGF 2 kl. Fl. : o.S.; + 20 ng/ml TGF a = 12 kl. Fl.	zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung
Montag Tag 6	T-47-D	2 kl. Fl. :m.S. 2 kl. Fl. : o.S. 2 kl. Fl. :m.S.; + 10 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. :m.S.; + 100 µg/ml Suramin 2 kl. Fl. : o.S.; + 50 ng/ml EGF 2 kl. Fl. : o.S.; + 20 ng/ml TGF a = 12 kl. Fl.	zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung zählen, lysieren, RNA - Isolierung

MW = Mediumwechsel
kl.Fl = kleine Zellkulturflasche

M = Medium

o.S. = ohne Serum
m.S. = mit Serum

6.9. Benutzte Primer und Kompetitorfragmente

Tab 6.2.1. Quelle und Größe der Primer und Beschreibung der Restriktionsfragmente

Rezeptor	Position	Größe des	Quelle:	Restr.	Restr.
	5'---3'	c-DNA-	Genbank:	Fragment	Fragment
		Fragmentes	Sequenz-		
		in bp	name		in bp
ErbB1	268-706	483	HSEGFPRE	----	----
ErbB2	363-745	382	HSEB2R	----	----
ErbB3	205-680	475	HSEGFBB	----	----
ErbB4	390-640	547	HRETYKIN	----	----
β-Aktin	----	712	-----	----	----

β-Mikroglobl = β-Mikroglobulin bp = Basenpaare
Restr. Fragment = Restriktions Fragment

Tab 6.2.2. Beschreibung der Kompetitorfragmente

Rezeptor	Größe des	Annealing-	Lokalisation	Annealing-	Lokalisation
	Kompetitorfr.	Temperatur	des	Temperatur	des
		des Kompetitorfr.	Kompetitorfr.	des komplement.	des komplement.
				Kompetitorfr.	Kompetitorfr.
	in bp	in °C	bp	in °C	bp
ErbB1	224	59,7	784	53	1008
ErbB2	184	60,1	804	60,8	988
ErbB3	344	61	724	61,1	1068
ErbB4	304	58,7	744	59,7	1048
β-Aktin	384	60,1	704	60,2	1088

β-Mikroglobl = β-Mikroglobulin bp = Basenpaare
Restr. Fragment = Restriktions Fragment Kompetitorfr. = Kompetitorfragment
Komplement. = komplementär

Tab 6.3. Beschreibung der verwendeten Primer-Sequenzen

Rezeptor	Sequenz 5'-3'	Annealing- Temperatur der c-DNA in °C	Lokalisation der c-DNA in bp
ErbB1	AAG CTC ACG CAG TTG GGC AC	58,6	268
ErbB2	CTA CCT GCC CAC CAA TGC CA	59,5	363
ErbB3	CTG AGT GTG ACC GGC GAT GC	55,5	205
ErbB4	CCA GCC CAG CGA TTC TCA GT	57	93
β-Aktin	CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT	60,1	657

Rezeptor	Sequenz 3'-5'	Annealing- Temperatur der c-DNA in °C	Lokalisation der c-DNA in bp
ErbB1	GGT TCT GGA AGT CCA TCG AC	53,1	706
ErbB2	CCC GAG AGC GGT TGG TGT CT	58,7	745
ErbB3	CAT CGC CCC TTG CAA ACC TC	63,2	680
ErbB4	TTT CTG TGG GTC CCC AGC AA	59,3	640
β-Aktin	GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC	60,2	1349

β-Mikrobl = β-Mikroglobulin bp = Basenpaare

6.10. Die pTNM Klassifikation des Mammakarzinoms

Tab.: 6.4.

Tumorausdehnung T		
TX		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		keine Evidenz für einen Primärtumor
Tis		Karzinoma in situ
T1		Tumor ≤ 2 cm
	T1 a	Tumor $\leq 0,5$ cm
	T1b	Tumor $> 0,5$ cm, aber nicht > 1 cm
	T1c	Tumor > 1 cm, aber nicht > 2 cm
T2		Tumor > 2 cm, aber nicht > 5 cm
T3		Tumor > 5 cm
T4		Tumor jeder Größe mit Infiltration der Thoraxwand * oder Haut **
	T4a	Infiltration der Thoraxwand
	T4b	Ödeme (inklusive "peau d'orange"), Ulzeration der Haut der Brust oder Satelliten-Hautknoten an derselben Brust
	T4c	beides (T4a und T4b)
Lymphknotenstatus N		
NX		regionale Lymphknoten nicht beurteilbar (z.B. früher entfernt)
N0		keine regionalen Lymphknoten-Metastasen
N1		Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
N2		Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, die aneinander oder an anderen Strukturen fixiert sind
N3		Metastasen in ipsilateralen Mamma-interna-Lymphknoten
Fernmetastasen M		
M0		keine Evidenz für distale Metastasen
M1		distale Metastasen (inklusive Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten)

* Zur Thoraxwand gehören Rippen, Interkostalmuskeln, M.serratus anterior, jedoch nicht der M. pectoralis major.

** Einziehungen der Retraktion der Mamille oder jede andere Hautveränderung (außer den unter T4b aufgeführten Veränderungen) kann bei T1, T2 oder T3 vorkommen ohne die Klassierung zu beeinflussen
(Wittekind, C. et al. : TNM-Klassifikation maligner Tumoren; 1997; Berlin, Heidelberg, New York; Springer)

Tab.: 6.5.

Subklassifikation relevanter Prognosefaktoren (nach Hermanek **)		
Gruppe I	TNM-Klassen histologischer Typ, Grading Steroidrezeptoren	wissenschaftlich und klinisch am besten fundierte Merkmale des Karzinoms mit der höchsten prognostischen Wertigkeit
Gruppe II A	Proliferationsmarker: MIB-1 bzw. Ki-67 S-Phasen-Fraktion Mitose-Index, Ploidie	klinisch und biologisch extensiv untersuchte Faktoren mit einheitlicher Wertigkeit in einer großen Anzahl von Untersuchungen
Gruppe II B	c-ErbB2, p53 vaskuläre Invasion	klinisch und biologisch extensiv untersuchte Faktoren mit uneinheitlicher Wertigkeit in einer kleineren Anzahl von Untersuchungen
Gruppe III	Weitere Faktoren	Faktoren, welche den Anforderungen von Gruppe 1 und Gruppe 2 nicht genügen

** [47]

Danksagung

Diese Arbeit ist meinem lieben Großvater, einem Menschen voller Güte, Größe und Menschlichkeit gewidmet.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern,
Dr. rer. biol. hum. J. Clement, den MTA's des onkologischen Labors,
U. Sonnefeld, Dr. nat. J. Sängner und Dr. med. U. Wedding.

Lebenslauf

Persönliche Daten

	Näder
Name	
Vorname	Hilmar Bert
<u>Geburtstag und -ort</u>	17.06.73 in Karl-Marx-Stadt
Familienstand	ledig
Adresse	Steiler Weg 7 09127 Chemnitz

Schulausbildung

	Besuch der J.-W.-Goethe POS
09/1980 – 06/1990	Polytechnische Spezialoberschule für Sprachen in Karl-Marx-Stadt, Sachsen
09/1990 – 06/1992	Besuch des Gauss-Gymnasiums in Chemnitz, Sachsen
26.06.1992	Abitur

Zivildienst

09/1992 - 09/1993	Ableistung des Zivildienstes in der anästhesiologischen Abteilung der Städtischen-Kliniken Chemnitz, Flemmingstraße
-------------------	---

Studium der Humanmedizin

10/1993 – 08/1995	Vorklinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
06.10.1995	Ärztliche Vorprüfung
ab 11/1995	Klinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
23.09.1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.10.1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998 – 01/1999	1. Abschnitt des Praktischen Jahres in der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Thusis, Kanton Graubünden, Schweiz
02/1999 – 06/1999	2. Abschnitt des Praktischen Jahres in der Klinik für Innere Medizin der Universität Jena, Klinik für Hämatologie/Onkologie
06/1998 – 09/1999	3. Abschnitt des Praktischen Jahres in der Klinik für Orthopädie der Universität Jena, Rudolf-Elle-Krankenhaus Eisenberg
12.11.1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beendigung des Medizinstudiums 11/1999 mit dem Prädikat : „gut“

<u>Promotion</u>

Seit 01/1997	Prof. habil. Dr. med. K. Höffken, Dr. nat. J. Clement Klinik für Innere Medizin II der Universität Jena: Onkologisches Forschungslabor Thema: Die ErbB-4 Rezeptor Tyrosinkinase-Expression und Regulat Zellen des Mammakarzinoms.
10/1997	Erstellung eines Posters zu dem Onkologischen Kongress der Deutsch-Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie mit zugehörigem Abstract

<u>Dienststellung</u>

Arzt im Praktikum in der Orthopädischen Klinik des Klinikums Meiningen
unter Chefarzt Dr. Buchner seit 2/2000

<u>Studienbegleitende Tätigkeiten</u>

Krankenpflegedienst

07/1990 – 09/1990	Krankenpflege in der Klinik für Orthopädie Zeißig-Wald- Krankenhaus Chemnitz
03/1995	Krankenpflege in der Frauenklinik Chemnitz

Famulaturen

02/1996	Famulatur in Innerer Medizin in den Städtischen Kliniken Chemnitz, Flemmingstraße Kardiologische Abteilung
10/1996	Famulatur in der orthopädischen Praxis Dr. med. A. Sternkopf, Facharzt für Orthopädie, Chemnitz
08/1997-09/1997	Famulatur an dem Royal Prince Alfred Hospital in Sydney (Australien) in der Abteilung für onkologische Chirurgie

Wissenschaftliche Mitarbeit

02/1990 – 06/1999	Mitarbeit an einer wissenschaftlichen Arbeit über alternative Schmerzmedikamentation bei Tumorpatienten an der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universität Jena
-------------------	--

<u>Sonstiges</u>

Fremdsprachen	Englisch (Schulkenntnisse und Studiensprachkurs) Russisch (Schulkenntnisse) Latein (Schulkenntnisse)
Programmiersprachen	Basic Turbo-Pascal
Persönliche Interessen	Literatur Tauch- und Wintersport Kunstgeschichte

Jena, den 10. Oktober 2000

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. biol. hum. J. Clement, Prof. Dr. med. K. Höffken, Dr. med. U. Wedding,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Chemnitz, 01.01.2001